

**Untersuchung der
Protein-Protein-Interaktion der Proteine
ppUL35 und ppUL35A des humanen
Cytomegalievirus mit dem zellulären
Protein Sorting Nexin 5**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Gregor Maschkowitz
Kiel, 2013

Erster Gutachter : Prof. Dr. Helmut Fickenscher

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung: 2.12.2013

Zum Druck genehmigt: 2.12.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	6
2 Summary	7
3 Einleitung	8
3.1 HCMV-Morphologie	8
3.2 Replikationszyklus von HCMV	11
3.3 Pathogenese und Therapie	13
3.4 Die HCMV-Tegumentproteine ppUL35 und ppUL35A	15
3.5 Die Proteinfamilie der Sorting Nexine und der Retromerkomplex	16
3.6 Zielsetzung	18
4 Material	20
4.1 Bakterienstämme	20
4.2 Plasmide	20
4.3 Oligonukleotide	21
4.4 siRNA	23
4.5 Antikörper	23
4.6 Verbrauchsartikel	24
4.7 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Zelllinien	25
4.8 Virusstämme	26
4.9 Chemikalien und Reagenzien	26
4.9.1 Reagenzsysteme	26
4.9.2 Pufferlösungen	26
4.10 Geräte	28
5 Methoden	29
5.1 Molekularbiologische Methoden	29
5.1.1 Plasmid-DNA-Präparation	29
5.1.2 DNA-Sequenzierung	29
5.1.3 Mutation des HCMV-Genoms im künstlichen bakteriellen Genom	29
5.2 Protein-Techniken	33
5.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
5.2.2 Koimmunpräzipitation	33
5.2.3 Immunblot	33
5.2.4 Zellfraktionierung	34
5.3 Zellkultur-Techniken	34
5.3.1 Zellkultur	34

5.3.2	Makropinozytosexperimente	34
5.3.3	Gewinnung von Monozyten abgeleiteten Makrophagen	35
5.3.4	Makropinozytosexperimente mit humanen Makrophagen	35
5.4	Virus-Techniken	35
5.4.1	HCMV-Replikationskinetik	35
5.4.2	HCMV-Titration	36
5.4.3	HCMV-Rekonstitution	36
5.4.4	Präparation von zellfreien HCMV-Partikeln	37
5.4.5	Rekonstitution von Adenoviren	37
5.4.6	Präparation von zellfreien Adenoviren	37
5.4.7	Titration von Adenoviren	37
5.4.8	Infektion von humanen Makrophagen mit Adenoviren	38
5.4.9	Transfektion von siRNA	38
5.4.10	Luciferase-Reporter-Experimente	38
5.4.11	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	38
5.4.12	Herstellerregister	39
6	Ergebnisse	40
6.1	Sorting Nexin 5 interagiert mit ppUL35 und ppUL35A	40
6.2	Die Membranassoziation von Sorting Nexin 5 bleibt bei Interaktion mit ppUL35 oder ppUL35A unverändert	44
6.3	ppUL35 und ppUL35A inhibieren die EGF-stimulierte Makropinozytose	45
6.4	Die Makropinozytose in humanen Makrophagen wird nicht durch ppUL35 oder ppUL35A inhibiert	46
6.5	Die Lokalisation des Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphatrezeptors wird durch ppUL35 und ppUL35A modifiziert	47
6.6	Die Insertion von fünf Aminosäuren im c-terminalen Bereich von ppUL35 führt zur Störung der Interaktion von ppUL35 und Sorting Nexin 5	48
6.7	Die transaktivierende Funktion von ppUL35Tn71 ist unabhängig von der Transposoninsertion	52
6.8	Die intrazelluläre Lokalisation von CI-M6PR ist unbeeinträchtigt durch ppUL35Tn71	55
6.9	Die Mutation von UL35 im viralen Genom führt zu Replikationsdefekten	56
6.10	Die Mutation von UL35 ist verantwortlich für eine Umverteilung von HCMV-Tegumentproteinen und Glykoproteinen	63
6.11	Die Modulation der Expression von Sorting Nexin 5 beeinflusst die Virusreplikation	65
6.12	Die Depletion von Sorting Nexin 5 stellt nach Infektion mit UL35-Mutanten die korrekte Lokalisation von gpUL55(gB) wieder her	67
6.13	Die Lokalisation der Glykoproteine gpUL75(gH), gpUL100(gM) und gpUL73(gN) ist unabhängig von UL35	68

7 Diskussion	70
7.1 Die Protein-Interaktion von ppUL35 und ppUL35A mit Sorting Nexin 5 beeinflusst intrazelluläre Transportprozesse	70
7.2 Die Regulation von Sorting Nexin 5 durch ppUL35 und ppUL35A ist wesentlich für die Virusreplikation	73
7.3 Sorting Nexine regulieren wichtige Prozesse in der viralen Replikation . .	76
7.4 Ausblick	79
8 Literaturverzeichnis	80
Abkürzungsverzeichnis	92
Danksagung	94
Publikationen	95
Erklärung	96

1 Zusammenfassung

Eine Infektion oder Reaktivierung des Humanen Cytomegalievirus (HCMV) in immun-supprimierten Patienten (HIV-Patienten, Organtransplantatempfänger) kann zu schweren Erkrankungen sowie Organschädigungen oder Organabstoßung führen. Die Aufklärung molekularer Prozesse während der Infektion ist entscheidend für das Verständnis viraler Replikation sowie die Entwicklung antiviraler Interventionen. Während der späten Phase der Infektion wird das Kapsid aus dem Zellkern zum viralen *Assembly Center* transportiert. Dort werden die vollständigen Viruspartikel aus Kapsiden, Tegumentproteinen und viralen Hüllproteinen gebildet. Das *Assembly Center* besteht aus ringförmig angeordneten Vesikeln, die aus dem Trans Golgi-Netzwerk und dem endosomalen Transportweg stammen. Das HCMV-Gen UL35 kodiert für zwei Proteine, ppUL35 und seine kurze Form ppUL35A, die neben einer transaktivierenden Funktion in der initialen Phase wichtige Funktionen in der späten Phase bei der Bildung der Partikel erfüllen. In einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* konnten mehrere zelluläre Interaktionspartner von ppUL35 identifiziert werden. Ziel dieser Arbeit war die Validierung und funktionelle Analyse einzelner dieser Protein-Interaktionen, um daraus Erkenntnisse über die Rolle von ppUL35 bzw. ppUL35A abzuleiten. Sorting Nexin 5 (SNX5), ein Bestandteil des Retromers und Teil des retrograden Transportweges, konnte als Interaktor beider UL35-Proteine identifiziert werden. Die transiente Expression von ppUL35 oder ppUL35A zeigte einen Einfluss auf den endosomalen Weg, erkennbar an der Umverteilung des kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphatrezeptors (CI-M6PR). Eine vergleichbare Umverteilung war für die Depletion von endogenem SNX5 beschrieben worden, so dass eine hemmende Funktion der UL35-Proteine angenommen wurde. Entsprechend führte die transiente Expression von SNX5 in infizierten Zellen zu einem verringerten Virustiter. Mittels Pentapeptid-Scanning-Mutagenese wurde eine SNX5-bindungsdefiziente UL35-Mutante identifiziert, die nach Transfektion keine CI-M6PR-Umverteilung bewirkte. Somit ist die Interaktion der UL35-Proteine mit SNX5 ursächlich für die Störung der zellulären Transportprozesse. Die Deletion bzw. Mutation von UL35 bzw. UL35A im HCMV-Genom führte zu einem verringerten Virustiter und einer veränderten Lokalisation des Glykoproteins gpUL55(gB). Dessen Reifungsprozess erfolgt, abweichend von anderen viralen Glykoproteinen, entlang des sekretorischen und endosomalen Weges. Durch siRNA vermittelte Depletion von SNX5 konnten die Virusreplikation der UL35-Mutanten teilweise auf Wildtyp-Niveau angehoben und die Lokalisation von gpUL55(gB) wiederhergestellt werden. Diese Arbeit zeigt, dass ppUL35 und ppUL35A die Lokalisation des essentiellen gpUL55(gB) maßgeblich durch die Regulation eines retrograden Transportweges bestimmen.

2 Summary

An infection or reactivation of Human Cytomegalovirus (HCMV) in immunocompromised individuals (HIV patients, organ transplant recipients) can lead to severe complications, organ damage or transplant rejection. The elucidation of molecular processes during infection is indispensable for our understanding of viral replication and the development of antiviral intervention strategies. During the late phase of infection, the viral capsid is transported out of the nucleus and is completed in the viral assembly center (AC) with tegument proteins and envelope proteins. The assembly center consists of circular rearranged vesicles from the trans golgi network and the endosomal pathway. The HCMV gene UL35 encodes for two proteins, ppUL35 and its shorter form ppUL35A. In addition to transactivation activity during the immediate early phase, UL35 fulfills an important role during the maturation of the virus particle. Several cellular proteins were identified as interaction partners of ppUL35 in a yeast two hybrid screen. The aim of this thesis was the validation and functional analysis of some of these protein interactions to gain insights into the role of ppUL35 and ppUL35A. Sorting Nexin 5 (SNX5), a component of the retromer and part of the retrograde transport pathway, was identified as an interaction partner of both UL35-proteins. Transient expression of ppUL35 and ppUL35A affected the endosomal pathway, as evidenced by a redistribution of the cation independent mannose-6-phosphate receptor (CI-M6PR). A comparable redistribution of CI-M6PR described after depletion of SNX5 led to the assumption of an inhibitory role for the UL35 proteins. Accordingly, the transient expression of SNX5 in infected cells resulted in a reduced virus titer. Pentapeptide scanning mutagenesis generated a SNX5 binding deficient ppUL35 mutant, whose transfection did not induce a redistribution of CI-M6PR. Therefore, the interaction of the UL35 proteins with SNX5 is the reason for the interference of the cellular transport pathways. Deletion or mutation of UL35 or UL35A in the HCMV genome led to a reduced virus titer and an altered localization of glycoprotein gpUL55(gB). The maturation process of gpUL55(gB), which differs from other viral glycoproteins, occurs along the secretory and endosomal transport pathways. RNAi induced depletion of SNX5 was able to increase virus replication of UL35 mutants almost to wildtype levels and to restore gpUL55(gB) localization. This thesis demonstrates that ppUL35 and ppUL35A control the localization of the essential gpUL55 (gB) through the regulation of a retrograde transport pathway.

3 Einleitung

Eine Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus (bzw. *human herpesvirus 5*, HHV5) verläuft für immungesunde Patienten meist ohne Symptome und führt zu keinen bleibenden Schäden. Jedoch etabliert HCMV eine lebenslange Infektion. Eine Neuinfektion oder Reaktivierung in immunsuprimierten Patienten, wie HIV-Patienten oder Transplantatempfängern, kann zu schweren Erkrankungen bzw. Organabstoßungen bei Transplantatempfängern führen. Eine kongenitale Infektion oder eine Infektion von Neugeborenen kann zu schweren Entwicklungsdefekten, wie Hörverlust, Gelbsucht oder Hepatosplenomegalie führen. HCMV gehört in der Virusordnung der *Herpesvirales* zur Familie der *Herpesviridae* und ist der wichtigste Vertreter der Unterfamilie der *Betaherpesvirinae* (Davison et al., 2009). Durch die strikte Wirtsspezifität der β -Herpesviren kann HCMV nur in Zellkulturversuchen oder anhand von klinischen Proben untersucht werden. Klinische Isolate von HCMV können *in vivo* und *in vitro* ein breites Spektrum humaner Zelltypen infizieren und in diesen replizieren. In akut infizierten Patienten konnte die Replikation von HCMV in vielen Organen nachgewiesen werden (Sinzger et al., 1995; Sinzger et al., 2008). Wirtszellen sind hauptsächlich Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen, dendritische Zellen, Makrophagen und glatte Muskelzellen.

3.1 HCMV-Morphologie

Genom

Das HCMV-Virion hat eine Größe von 230 nm und besteht wie alle Herpesviren aus Hülle, Tegument und Kapsid mit dem DNA-Genom (Abb.3.1A). Das HCMV-Genom ist ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom und umfasst ca. 230.000 Basenpaare. HCMV hat im Vergleich mit anderen humanen Herpesviren das größte und komplexeste Genom. Einerseits konnte von den bislang annotierten 165 - 252 offenen Leserastern nicht für alle Leseraster ein Produkt und eine Funktion nachgewiesen werden (Chee et al., 1990; Murphy et al., 2003; Davison et al., 2003), andererseits scheint die Kodierungskapazität noch weitaus umfangreicher zu sein als bisher angenommen (Stern-Ginossar et al., 2012). Das HCMV-Genom wird in zwei Abschnitte unterteilt: *long* und *short* mit den Kernbereichen *unique long* und *unique short*. Diese Bereiche werden von den terminalen repetitiven Sequenzen (TRL und TRS) und den internen repetitiven Sequenzen (IRL und IRS) flankiert (Abb.3.1B). Die Gene werden nach ihrer Lokalisation in den *unique long* oder

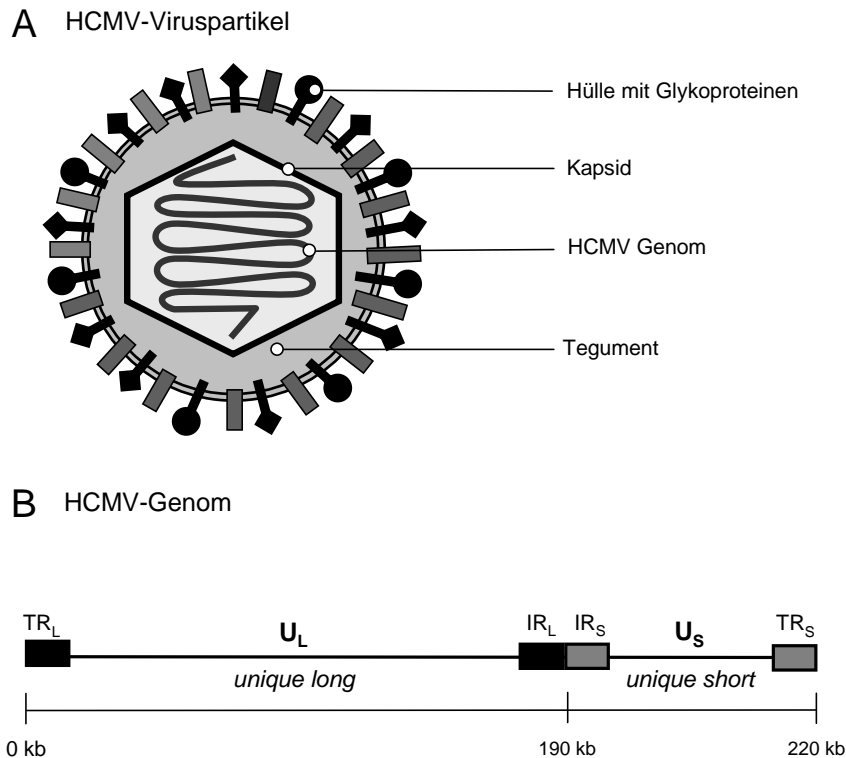


Abbildung 3.1 – Schematische Darstellung des HCMV-Virions (A) und des HCMV-Genoms (B). (A) Das HCMV-Virion besteht aus einer Hüllmembran, die mit viralen Glykoproteinen besetzt ist, der Tegumentschicht zwischen Hülle und dem Kapsid. Das Kapsid umschließt das doppelsträngige DNA-Genom. (B) Das Genom umfasst 230 kb und besteht aus *unique long* (UL) und *unique short* (US) Bereichen, die durch interne (IRL/IRS) und terminale repetitive Elemente (TRL/TRS) flankiert werden.

unique short Bereiche als UL oder US bezeichnet und nummeriert. Die Genprodukte werden als p (Protein), pp (Phosphoprotein) oder gp (Glykoprotein) und der entsprechenden Genbezeichnung benannt. Parallel dazu besteht eine ältere Nomenklatur, die sich meist auf die Molekülmasse der Proteine bezieht und zusätzlich in Klammern angegeben wird (z.B. ppUL82(pp71)) (Landini und Spaete, 1993). In der Forschung werden verschiedene HCMV-Stämme mit unterschiedlicher Herkunft verwendet. So genannte HCMV-Laborstämme, wie AD169 (Rowe et al., 1956), wurden vor ihrer Klonierung in künstliche bakterielle Chromosomen (BAC) extensiv in Fibroblasten passagiert und sind an die Replikation in Fibroblasten angepasst. Diese Anpassung führte teilweise zu genomischen Veränderungen (Cha et al., 1996) und zu einem stark eingeschränkten Zelltropismus. HCMV-Stämme, die von klinischen Isolaten abgeleitet wurden, wurden nur

kurz in Fibroblasten passagiert und in BACs kloniert. Diese Stämme (z.B. TB40E BAC4) infizieren und replizieren in allen für die Pathogenese relevanten Zelltypen (Sinzger et al., 2008).

Kapsid

Das HCMV-Genom wird ohne DNA-bindende Proteine in ein ikosaedrisches Kapsid verpackt. Das Kapsid wird aus den Strukturproteinen pUL86 (*major capsid protein*), pUL85 (*minor capsid*), pUL46 (*minor capsid protein-binding protein*) und pUL48/49 (*smallest capsid protein*) zusammengesetzt und hat eine Größe von ca. 130 nm (Gibson, 2008). An einem Eckpunkt des Kapsids wird durch Portalproteine eine Öffnung gebildet. Durch den so genannten Portalkomplex erfolgt die Ein- und Ausschleusung des viralen Genoms (Dittmer et al., 2005a; Dittmer et al., 2005b; Holzenburg et al., 2009).

Tegument

Charakteristisch für alle Herpesviren ist eine Proteinschicht zwischen Kapsid und Hülle, die Tegument genannt wird. Im Tegument von HCMV konnten virale Tegumentproteine, Wirtszellproteine und virale als auch zelluläre RNA nachgewiesen werden (Varnum et al., 2004; Terhune et al., 2004). Tegumentproteine erfüllen Funktionen beim Viruseintritt, der Regulation der zellulären und der viralen Genexpression, der Umgehung der Immunantwort und der Virionenreifung (Kalejta, 2008). Infektiöse Viruspartikel setzen sich aus ca. 71 viralen Proteinen in unterschiedlicher Anzahl (Varnum et al., 2004) zusammen, von denen die Hälfte wahrscheinlich Tegumentproteine sind. Wichtige Tegumentproteine sind ppUL83(pp65), ppUL32(pp150) und ppUL82(pp71). Trotz der Identifizierung und Charakterisierung von bis zu 21 Tegumentproteinen wurden bislang kaum Erkenntnisse über die Struktur des Teguments gewonnen. Lange Zeit ging man von einer zufälligen Anordnung im Viruspartikel aus. Spezifische Interaktionen zwischen Tegumentproteinen und Kapsidproteinen bzw. Tegumentproteinen und der Hülle deuten jedoch auf eine geordnete Struktur hin (Chen et al., 1999; Phillips und Bresnahan, 2011). Dreidimensionale Rekonstruktionen aus cryo-elektronenmikroskopischen Bildern einzelner Viruspartikel zeigten eine ikosaedrische netzartige Anordnung um das Kapsid und eine pleomorphe Verteilung in der Nähe der Hülle (Yu et al., 2011).

Hülle

Herpesviren sind von einer Hüllmembran umgeben, die vom sekretorischen Apparat und endosomalen Vesikeln der Wirtszelle abgeleitet wurde. Die Hülle enthält virale Glykoproteinkomplexe, die für den Viruseintritt, die Übertragung von Zelle zu Zelle, die Reifung

der Virionen und den Zelltropismus verantwortlich sind. Diese Membranproteinkomplexe werden durch verschiedene virale Glykoproteine während des Transports entlang des sekretorischen Weges gebildet. Der Glykoproteinkomplex gcI wird durch Homodimere von gpUL55(gB) gebildet. Glykoproteinkomplex gcII setzt sich aus gpUL100(gM) und gpUL73(gN), die über Disulfidbrücken verbunden sind, zusammen. Die Glykoproteine gpUL75(gH), gpUL115(gL) bilden mit gpUL74(gO) den Glykoproteinkomplex gcIII (Eickmann et al., 2006; Mocarski et al., 2007). Ein alternativer Komplex von gpUL75(gH) und gpUL115(gL) mit den Glykoproteinen gpUL128, gpUL130 und gpUL131 ist für den erweiterten Zelltropismus klinischer Isolate verantwortlich (Hahn et al., 2004; Wang und Shenk, 2005). Das Glykoprotein gpUL55(gB) ist eines der evolutionär konserviertesten Hüllproteine in der Familie der Herpesviren und ist in Viruspartikeln am häufigsten vertreten. HCMV gpUL55(gB) spielt als Hüllprotein vorrangig eine Rolle während des Anhaftens des Virus an die Wirtszelle und der Fusion der viralen und der zellulären Membran (Compton et al., 1992; Compton et al., 1993; Kari und Gerhz, 1993). Im endoplasmatischen Retikulum bilden sich über Disulfid-Bindungen Homodimere (Britt und Vugler, 1992), die später durch proteolytische Spaltung mittels Furin in die konvalent verbundenen Fragmente gp116 und gp55 konvertiert (Britt und Auger, 1986) werden. Das Glykoprotein gpUL55(gB) wird über den sekretorischen Weg zur Zellmembran transportiert und über Endozytose und frühe Endosomen zurück in das TGN transportiert (Radsak et al., 1996; Sanchez et al., 2000; Jarvis et al., 2002).

3.2 Replikationszyklus von HCMV

HCMV dringt je nach Zelltyp über Membranfusion oder über Endocytose in Wirtszellen ein. Mehrere Rezeptorkandidaten wurden beschrieben, doch die Rolle dieser Proteine ist noch umstritten (Isaacson et al., 2008). Nach dem Eindringen in die Wirtszelle wird das Kapsid mit dem Virusgenom zum Zellkern transportiert und das virale Genom in den Zellkern geschleust. Charakteristisch für Herpesviren ist die koordinierte kaskadenartige Genexpression, die sich in drei aufeinander folgende Abschnitte unterteilt: sehr frühe (*immediate early*; IE), frühe (*early*; E) und späte Phase (*late*; L) (Michelson-Fiske et al., 1977; Stinski, 1978). Unmittelbar nach dem Einschleusen des viralen Genoms in den Kern beginnt, unabhängig von der Expression viraler Gene, die sehr frühe Phase und hält ungefähr 6 Stunden an. Während der *immediate early* Phase werden regulatorische Proteine translatiert, welche neben der Aktivierung der frühen Phase zelluläre Prozesse wie die Immunantwort, den Zellzyklus, die Antigenpräsentation und anschließende virale Replikationsschritte steuern (Castillo und Kowalik, 2002; Stinski und Meier, 2007).

Wichtige IE-Genprodukte sind pUL123(IE1) und pUL122(IE2) (Mocarski et al., 1996;

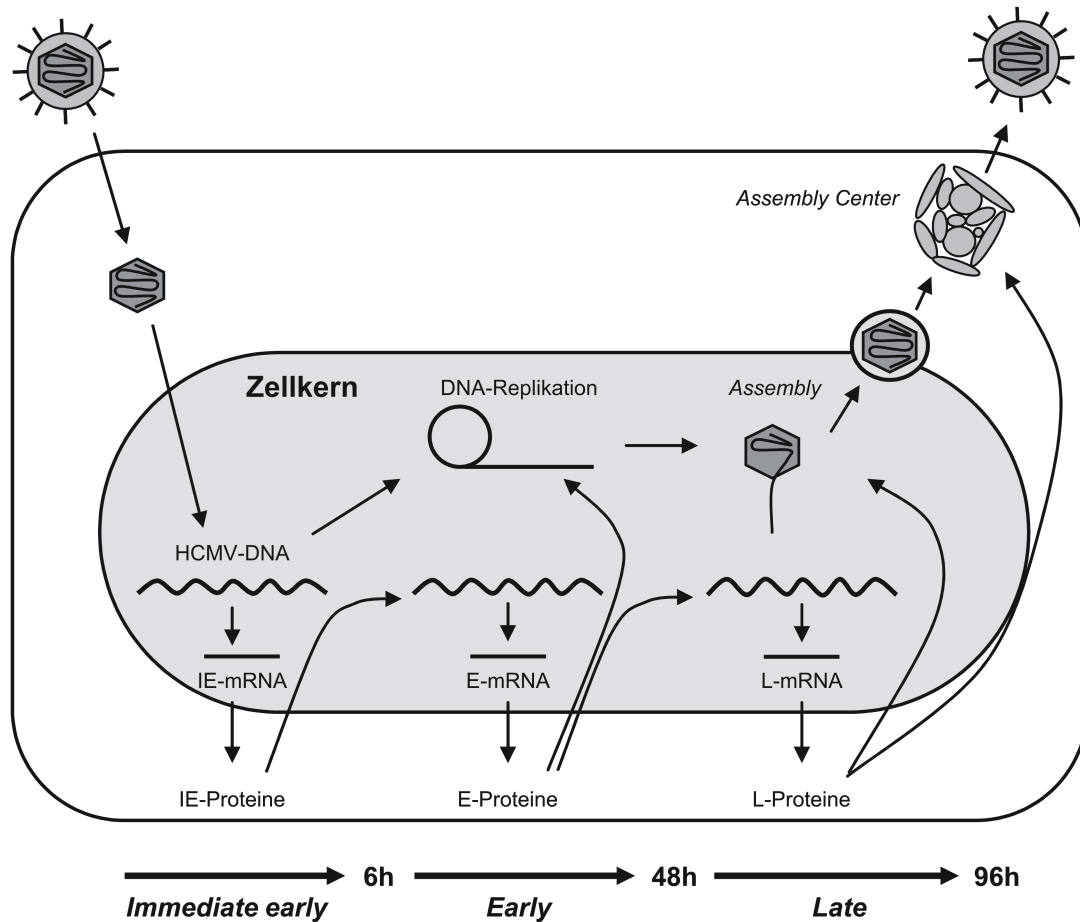


Abbildung 3.2 – Replikationszyklus von HCMV. Nach dem Eindringen des HCMV-Virions in die Zelle wird das Kapsid zum Zellkern transportiert und die virale DNA in den Zellkern geschleust. Während der *immediate early*-Phase werden Proteine zur Regulation der viralen und zellulären Genexpression translatiert. In der *early*-Phase werden Proteine für die Genom-Replikation und den Nukleotidstoffwechsel translatiert. Während der späten (*late*) Phase werden vorrangig virale Strukturproteine translatiert, das virale Genom in die Kapside verpackt und aus dem Zellkern geschleust. Im *Assembly Center* erhält das Viruspartikel die Tegumentschicht und die endgültige Hülle und wird anschließend aus der Zelle freigesetzt.

Marchini et al., 2001), die virale und zelluläre Promotoren regulieren. In der frühen Phasen (*early*) werden vorrangig Proteine für die DNA-Replikation und den Nukleotidstoffwechsel translatiert (White und Spector, 2007). Wichtige Proteine der frühen Phase sind die virale Polymerase pUL54, der Polymerase-Prozessivitätsfaktor ppUL44

oder die Kinase pUL97. Etwa 14 Stunden nach der Infektion beginnt die Replikation des HCMV-Genoms. Die späte Phase der Infektion setzt nach etwa 30 Stunden ein. Genprodukte der späten Phase sind überwiegend Strukturproteine wie Kapsid-, Tegument- und Glykoproteine (Anders et al., 2007). In dieser Phase wird das virale Genom in das Kapsid verpackt und aus dem Kern transportiert. Im Cytoplasma folgt die Anlagerung von Tegumentproteinen (Mettenleiter et al., 2009). Die Umhüllung mit der Hüllmembran findet bei Eintritt in cytoplasmatische Vesikel, welche vom Trans-Golgi Netzwerk (TGN) und endosomalen Vesikel abgeleitet wurden, statt. Das Cytomegalievirus verfügt hierbei über eine Besonderheit unter den Herpesviren. Das TGN und endosomale Vesikel werden in infizierten Zellen neu arrangiert und bilden eine konzentrisch aufgebaute Struktur mit dem TGN als äußere Schicht und endosomalen Vesikel als Zentrum (Das et al., 2007). Dieses Gebilde wird auch virales *Assembly Center* genannt (Sanchez et al., 2000; Das und Pellett, 2011; Tandon und Mocarski, 2012). Die umhüllten Viruspartikel werden in Vesikeln zur Plasmamembran befördert und freigesetzt (Mettenleiter et al., 2009). Neben der Infektion mit lytischer Replikation können Wirtszellen auch latent infiziert werden. Das Genom verbleibt als episomale DNA in der Zelle und die virale Genexpression ist auf wenige Gene beschränkt. Dadurch etabliert sich eine lebenslange Infektion mit HCMV. Die lytische Replikation kann durch unterschiedliche Faktoren reaktiviert werden und stellt vor allem bei immunsupprimierten Patienten eine große Gefahr dar. Wichtige Reservoirs für die Latenz sind Endothelzellen und bestimmte myeloide Zellpopulationen, wie Monozyten oder dendritische Zellen (Sinclair und Sissons, 2006).

3.3 Pathogenese und Therapie

Anfang des 20. Jahrhundert berichteten Pathologen von auffällig morphologisch veränderten Zellen von verstorbenen Neugeborenen. Speicheldrüsen und andere Organe wiesen cytoplasmatische Einschlusskörperchen auf und besaßen eine Morphologie, die als „Eulenaugen“ beschrieben wurde. Aufgrund dieser charakteristischen Befunde wurde diese Erkrankung als cytomegalische Einschlusskrankheit (*cytomegalic inclusion disease*, CID) benannt. CID erwies sich auch als Ursache für neurologische Entwicklungsdefizite bei Neugeborenen. Ähnliche Organschädigungen und Entwicklungsstörungen wurden in verschiedenen Tieren beobachtet. Die Ähnlichkeit der Gewebsveränderungen mit Läsionen des Herpes Simplex Virus führte bald zur Schlußfolgerung, dass eine Virusinfektion für die Veränderungen verantwortlich ist. Als Ursache wurde in den 1950er Jahren schließlich das Humane Cytomegalievirus isoliert (Smith, 1956, Rowe, 1956).

HCMV kann kongenital, perinatal, über Muttermilch oder über Blut und Blutpro-

dukte, sowie durch Kontakt mit Urin, Speichel oder Sperma übertragen werden. Für immunkompetente und gesunde Menschen verläuft eine Infektion mit HCMV meist ohne Symptome und ohne gesundheitliche Folgen. Jedoch hält HCMV nach der Primärinfektion eine lebenslange Infektion aufrecht. Bei Primärinfektion oder Reaktivierung von HCMV in immunkompromittierten Patienten wirkt HCMV als klassischer opportunistischer Krankheitserreger. Die Schwere der Erkrankungen korrespondiert mit dem Grad der Virusreplikation, wobei eine starke Replikation zu einer massiven Organschädigung führen kann. Eine Reaktivierung erfolgt meist, wenn durch beeinträchtigte (HIV-Patienten) oder unterdrückte Immunantwort (Transplantatempfänger) die Virusreplikation möglich ist. Die genauen Mechanismen der Reaktivierung sind bisher nicht verstanden. Es wird vermutet, dass proinflammatorische Cytokine und Stresshormone (Mehta et al., 2000; Sinclair und Sissons, 2006; Reeves und Sinclair, 2008) zu einer Differenzierung von latent infizierten Zellen und somit zur Virusreplikation führen.

Eine Infektion oder Reaktivierung von HCMV in AIDS-Patienten kann Hepatitis, Retinitis oder Colitis zur Folge haben. Durch die Einführung einer effektiven antiretroviralen Therapie und die damit einhergehende Verbesserung des Immunstatus konnte die Inzidenz bei HIV-positiven Patienten gesenkt werden. Eine Primärinfektion oder Reaktivierung von HCMV bei Transplantatempfängern kann zu Organschädigungen bis zur Transplantatabstoßung führen. Bei Föten und Neugeborenen kann eine HCMV-Infektion zu Hörverlust, Organschädigungen (Ikterus, Hepatosplenomegalie etc.) und in einigen Fällen auch zu Schädigungen des zentralen Nervensystems (Mikrozephalie etc.) kommen.

Für die Therapie von HCMV-Infektionen stehen verschiedene Wirkstoffe zur Verfügung. Ganciclovir (GCV) (Martin et al., 1983) ist ein Nukleosidanalogue, das in infizierten Zellen durch die virale Kinase pUL97 monophosphoryliert und durch zelluläre Kinasen in ein Triphosphat umgewandelt wird. In dieser Form inhibiert GCV die virale Polymerase (Biron, 2006). Die Spezifität für infizierte Zellen wird dabei durch die Phosphorylierung durch pUL97 und die spezifische Hemmung der viralen Polymerase, im Gegensatz zu zellulären Polymerasen, erreicht. In der klinischen Therapie wird meist sowohl GCV als auch sein Derivat val-GCV eingesetzt (Torres-Mariz und Boucher, 2008; Jacobsen und Sifontis, 2010). Das antisense Oligonukleotid Fomivirsen (Anderson et al., 1996) bindet an *immediate-early*-mRNA und verhindert die Translation von IE2. Fomivirsen wird bei HCMV-induzierter Retinitis intravitreal injiziert und kommt nicht zur systemischen Behandlung von HCMV-Infektionen zum Einsatz. Ein weiterer Wirkstoff ist Foscarnet (Eriksson et al, 1982), ein Pyrophosphatanalogue, welches die Freisetzung von Pyrophosphat durch die virale Polymerase inhibiert und dadurch einen Kettenabbruch bewirkt. Die bisher zugelassenen Wirkstoffe zur Therapie von HCMV-Infektionen sind nicht für alle

Patienten verträglich (Torres-Mariz und Boucher, 2008; Jacobsen und Sifontis, 2010) und können durch Resistenzbildung wirkungslos werden. Die Entwicklung von Resistenzen ist abhängig von der Länge der Behandlung und vom Status der Immunsuppression des Patienten. Resistenzen gegen eine HCMV-Therapie werden durch Mutationen in den Genen UL54 (virale DNA-Polymerase) und UL97 (virale Kinase) hervorgerufen. Eine aufgrund von Resistenzmutationen nicht behandelbare HCMV-Infektion kann je nach Immunstatus des Patienten von asymptomatischen bis zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen. (Gilbert und Boivin, 2005; Lurain und Chou, 2010).

Seit den 1970er Jahren wurde versucht mit attenuierten HCMV-Stämmen Impfstoffe zu entwickeln. Die Weiterentwicklung dieser Strategie wurde jedoch aufgrund von Bedenken einer latenten Infektion durch die attenuierten Virusstämme verlangsamt. Aktuelle Impfstoffkandidaten basieren auf der Expression von HCMV-Proteinen durch Vektorsysteme, rekombinanten HCMV-Proteinen oder Peptiden (Schleiss, 2008; Sung und Schleiss, 2010). Trotz fortlaufender Forschung konnte bisher kein Impfstoff gegen HCMV eingeführt werden.

3.4 Die HCMV-Tegumentproteine ppUL35 und ppUL35A

Das HCMV Gen UL35 kodiert für zwei 3'-coterminale mRNAs, welche in die Proteine ppUL35 (75 kDa) und ppUL35A (22 kDa) translatiert werden (Liu und Biegalke, 2002). Das 640 Aminosäuren umfassende ppUL35 wird nur während der späten Phase translatiert und im Gegensatz zu ppUL35A in das Viruspartikel verpackt. ppUL35A, welches dem Carboxy-Terminus von ppUL35 (AS 448-640) entspricht, ist während der frühen Phase bis in die späte Phase nachweisbar (Liu und Biegalke, 2002). Beide Proteine sind sowohl im Kern als auch im Cytoplasma nachweisbar (Liu und Biegalke, 2002; Schierling et al., 2004; Salsman et al., 2011). In transient transfizierten Zellen konnte eine Aktivierung des *major immediate early promoter/enhancer* (MIEP) durch ppUL35 in Luciferase-Reporteranalysen nachgewiesen werden. Diese Aktivierung konnte durch die Kotransfektion von ppUL35 und ppUL82(pp71) verstärkt werden (Liu und Biegalke, 2002; Schierling et al., 2004). Für die kooperative Aktivierung des MIEP durch ppUL35 und ppUL82(pp71) ist möglicherweise die physikalische Interaktion zwischen beiden Proteinen verantwortlich (Schierling et al., 2004). Experimente in transient transfizierten humanen Fibroblasten ergaben, dass ppUL35 in Anwesenheit von ppUL82(pp71) in Kernkörperchen (*nuclear bodies*, NB) bzw. PODs (*promyelocytic leukemia oncogene domain*) rekrutiert wird (Schierling et al., 2004). Bei Untersuchungen mit transient transfizierten Zellen der Osteosarcom-Zelllinie U2OS konnte nachgewiesen werden, dass ppUL35 Kernkörperchen

formt und in diese NBs verschiedene Proteine von anderen Kernkörperchen rekrutiert, wie beispielsweise PML, SP100 oder DAXX. Die Kotransfektion von ppUL82(pp71) führte zu einer vermehrten Bildung dieser ppUL35-NBs (Salsman et al., 2011). Mittels Massenspektrometrie konnte USP7, eine Ubiquitin-spezifische Protease, und DCAF1, DDB1 und DDA1, Komponenten des Cul4-DCAF1-E3 Ubiquitin-Ligase Komplexes und der DNA-Reparatur-Antwort, als zelluläre Interaktoren von ppUL35 identifiziert werden (Salsman et al., 2012). In transient transfizierten Zellen interagiert nur ppUL35 mit DCAF1, DDB1 und DDA1, jedoch nicht ppUL35A. Interessanterweise führt die Expression von ppUL35 in HeLa-Zellen zu einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase und der Aktivierung weiterer Komponenten der DNA-Reparatur. Die Expression von ppUL35A allein hat jedoch keine Auswirkungen. Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass ppUL35 durch die Interaktion mit Komponenten der DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle die virale Replikation unterstützt (Salsman et al., 2012). Rekombinante Viren mit Deletion des gesamten UL35 Leserahmens weisen ein deutliches Replikationsdefizit bei niedrigem Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu Zielzellen (*multiplicity of infection*, MOI) auf (Schierling et al., 2005). Auch bei höheren MOI konnte der Virustiter des Wildtyps nicht erreicht werden, was für eine weitere Störung in der späten Phase spricht. HFF Zellen, die mit diesem Virus infiziert wurden, zeigen in späten Phasen der Infektion (96hpi) eine nukleäre Lokalisation von ppUL83(pp65) und ppUL82(pp71) auf, während diese Proteine in Wildtyp-infizierten Fibroblasten im Cytoplasma vorliegen (Schierling et al., 2005). Dies deutet auf eine Rolle von ppUL35 und ppUL35A während des Zusammensetzens der Viruspartikel hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ppUL35 in der frühen Phase der Infektion gemeinsam mit ppUL82(pp71) in PML- Kernkörperchen zum einen die Aktivierung der viralen Genexpression fördert und zum anderen durch Bindung zellulärer Proteine zelluläre Prozesse moduliert. In der späten Phase erfüllen ppUL35 und ppUL35A Aufgaben während des Zusammensetzens der Viruspartikel.

3.5 Die Proteinfamilie der Sorting Nexine und der Retromerkomplex

Sorting Nexine gehören zu einer großen Gruppe von evolutionär konservierten Proteinen, welche die Phox-homologe Domäne (PX) gemeinsam haben. Die PX-Proteindomäne ist eine lipidbindende Domäne und bindet an Phosphoinositole (Ellson et al., 2002). In Säugern konnten 33 verschiedene Sorting Nexine identifiziert werden (Cullen, 2008).

Die Familie der Sorting Nexine kann in drei verschiedene Untergruppen unterteilt werden (Tabelle 3.1): eine Gruppe Proteine mit einer zusätzlichen BAR-Domäne, eine

Tabelle 3.1 – Einteilung der humanen Sorting Nexine in Untergruppen

Sorting Nexine mit BAR-Domäne	Sorting Nexine ohne zusätzliche Domäne	Sorting Nexine mit sonstigen Domänen
SNX 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 18, 30, 32, 33	SNX 3, 10, 11, 12, 16, 20, 21, 22, 24, 29	SNX 13, 14, 15, 17, 19, 23, 25, 26, 27, 28, 3

Gruppe ohne zusätzliche Proteindomänen und eine Gruppe Sorting Nexine mit weiteren Proteindomänen, wie z.B. Mikrotubuli-interagierenden Domänen (Cullen, 2008). Obwohl hauptsächlich an endosomalen Membranen lokalisiert, konnten Sorting Nexine auch an anderen Organellen bzw. Membranen nachgewiesen werden. Die Lokalisation an unterschiedlichen Membranen und Subdomänen wird durch die Spezifität der PX-Domäne für unterschiedliche Phosphoinositol-Lipide erzielt (Cullen, 2008). Die BAR-Domäne (Bin, Amphiphysin, Rvs) hat eine längliche, halbmondförmige Struktur, die aus alpha-helikalen Elementen zusammengesetzt ist. Dimerisierung mit einem anderen BAR-Modul führt mittels elektrostatischer Wechselwirkungen zur Bindung an stark gekrümmte Membranen (Peter et al., 2004; Mim und Unger, 2012). Sorting Nexine mit BAR-Domäne können durch die Bindung an tubuläre Subdomänen von endosomalen Vesikel diese gekrümmten Membranen ausbilden und stabilisieren. Die endosomalen Vesikel gehören zum endosomalen Netzwerk, in welchem auch Proteine von der Plasmamembran zum Trans-Golgi-Netzwerk transportiert werden. Proteine können vom frühen Endsom zum TGN über drei Wege gelangen: direkter retrograder Transport vom frühen Endsom, vom frühen Endsom über das späte Endsom zum TGN und vom frühen Endsom über das Recycling-Endsom zum TGN. Für den retrograden Transport von frühen Endsom direkt zum TGN konzentriert der Multiproteinkomplex Retromer aufgenommene Proteine in den tubulären Domänen der frühen Endosomen. Durch Anlagerung weiterer Proteine an diese tubulären Domänen wird die Membran abgeschnürt und es entsteht ein Vesikel, das zum TGN transportiert wird. Der Retromerkomplex besteht aus zwei Subkomplexen: dem Erkennungskomplex für die Erkennung der Ladung und dem SNX-BAR-Komplex zur Modulation der Membran von frühen Endosomen (Abb. 3.3). Der Erkennungskomplex ist ein Trimer aus den Untereinheiten Vps26A bzw. Vps26B, Vps29 und Vps35 (Haft et al., 2000; Kerr et al., 2005; Burgacic et al. 2010). Der SNX-BAR-Komplex besteht aus SNX-Dimeren aus SNX1 oder SNX2 mit SNX5 oder SNX6 (Carlton et al., 2004; Griffin et al., 2005; Rojas et al., 2007; Wassmer et al., 2007). Als Teil des Retromer-Komplexes bindet SNX5 an die Membran von frühen Endosomen (Merino-Trigo et al., 2004). Durch biochemische und strukturelle Untersuchungen konnte nachgewiesen werden,

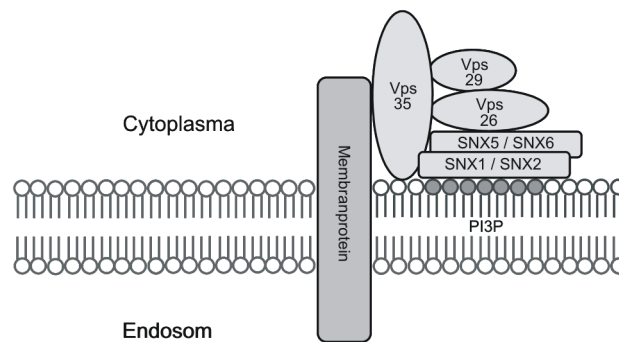


Abbildung 3.3 – Modell des Retromerkomplexes. Der Retromerkomplex besteht aus SNX5 bzw. SNX6 und SNX1 bzw. SNX2 für die Modulation der endosomalen Membran und Vps35, Vps29 und Vps26A,B für die Substraterkennung. Die PX-Domänen der Sorting Nexine erkennen Phosphoinositolgruppen (PI3P) in der endosomalen Membran.

dass SNX5 an Phosphatidylinositol-4-Phosphat, Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (Merino-Trigo et al., 2004) und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (Koharudin et al., 2009) bindet. SNX5 interagiert mit SNX1, SNX2 und mit SNX6 (Wassmer et al., 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass SNX5 auch mit Proteinen des Retromer-Subkomplex für die Erkennung der Ladung interagiert (Wassmer et al., 2009). Als weitere Interaktoren von SNX5 wurden p150 glued (Wassmer et al., 2009), Dock180 (Hara et al., 2008) und Mind bomb (Yoo et al., 2006) beschrieben. Eine Depletion von SNX5 führte zu einem gestörten retrograden Transport des Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphatrezeptors (Wassmer et al., 2007) und einer veränderten Lokalisation von Indikatorproteinen des Trans-Golgi-Netzwerks (Hara et al., 2008). Neben der Funktion als Teils des Retromerkomplexes wurde für SNX5 auch eine Funktion in der Makropinocytose beschrieben. Stabil mit SNX5 transfizierte Zellen zeigten eine höhere Aufnahme von FITC-Dextran nach Stimulation mit EGF als entsprechende Kontrollexperimente (Lim et al., 2008). Weiter konnte auch gezeigt werden, dass SNX5 auch für Makropinozytose in Makrophagen wichtig ist (Lim et al., 2012).

3.6 Zielsetzung

Aufgrund der schweren klinischen Komplikationen einer HCMV-Infektion bei immunsuprimierten Patienten ist es wichtig die Pathogenese und die Auswirkungen auf den Wirt zu untersuchen. Umfangreiche Untersuchungen des HCMV-Genoms konnten zahlreiche virale Genprodukte identifizieren. Für viele dieser Proteine konnte noch keine

Funktion nachgewiesen werden. Das Tegumentprotein ppUL35 hat in der frühen Phase der Virusinfektion eine transaktivierende Funktion und rekrutiert zelluläre Proteine in Kernkörperchen. Rekombinante HCMV-Stämme, bei denen das UL35-Gen deletiert wurde, zeigen jedoch auch deutliche Defekte während der späten Phase der Infektion und des Zusammensetzen des Virions. Daher sollte die Frage untersucht werden, welche Rolle ppUL35 und ppUL35 während der späten Phase der HCMV Infektion spielen und welche Aufgabe sie in der Regulation zellulärer Prozesse erfüllen. Die Identifikation von zellulären Proteinen, die mit ppUL35 bzw. ppUL35A interagieren, und die Aufklärung der funktionellen Rolle dieser Protein-Protein-Interaktion sollten als Ausgangspunkt Hinweise auf zelluläre Prozesse liefern. Diese Erkenntnisse sollten mittels rekombinanten Viren auf ein Zellkulturmodell übertragen werden und weitere Zusammenhänge über die Rolle von ppUL35 und ppUL35A während des Zusammensetzens des Viruspartikels aufzeigen.

4 Material

4.1 Bakterienstämme

DH10B (Grant et al., 1990) DH10B TB40/E (Sinzger et al., 2009)

4.2 Plasmide

Tabelle 4.1 – Plasmide

Plasmid	Referenz
pENTR3C-CIAPIN1	eigene Klonierung. PCR-Produkt aus cDNA von humanen Fibroblasten (HFF) wurde in pENTR3C ligiert
pDest-YFP-CIAPIN1	eigene Klonierung, CIAPIN1-Kassette wurde mittels Gateway-Rekombination (Invitrogen) aus pENTR3C in pDest-491 übertragen.
pDest-mRFP-CIAPIN1	eigene Klonierung, CIAPIN1-Kassette wurde mittels Gateway-Rekombination (Invitrogen) aus pENTR3C in pDest-733 übertragen.
pDest-FLAG-CIAPIN1	eigene Klonierung, CIAPIN1-Kassette wurde mittels Gateway-Rekombination (Invitrogen) aus pENTR3C in pDest-733 übertragen
pCAGGS-FLAG-SNX5-H1	Hara et al., 2008
pCAGGS-FLAG-SNX5-H2	Hara et al., 2008
pCAGGS-FLAG-SNX5-PX	Hara et al., 2008
pCAGGS-FLAG-SNX5-BAR	Hara et al., 2008
pcDNA3-FLAG-SNX5	Teasdale et al., 2001
pcDNA3-UL82	Schierling et al., 2004
pcDNA3-UL35	Schierling et al., 2004

Tabelle 4.1 – Plasmide

Plasmid	Referenz
pcDNA3-UL35A	Schierling et al., 2004
pcDNA3-UL35Ad3ATG	K. Schierling, unveröffentlicht
pCMV71	Liu und Stinski, 1992
pDest-433	Domenic Esposito, National Laboratory for Cancer Research, Frederick, USA
pDest-515	Domenic Esposito, National Laboratory for Cancer Research, Frederick, USA
pDest-733	Domenic Esposito, National Laboratory for Cancer Research, Frederick, USA
pDEST-mRFP-UL35	M. Winkler, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen
pDEST-mRFP-UL35A	M. Winkler, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen
pEPkan-S2	Tischer et al., 2006
pHM287	Winkler et al., 1994
pKD46S	Datsenko und Wanner, 2000; M. Winkler, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen
AdenoAdTrackCMV	He et al., 1998
AdenoAdTrackCMV-UL82	M. Winkler, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen
AdenoAdTrackCMV-UL35	M. Winkler, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen
AdenoAdTrackCMV-UL35A	M. Winkler, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen

4.3 Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net bezogen.

Tabelle 4.2 – Oligonuklotide

Oligonukleotide	Sequenz
ON1 (UL35kon5)	CTG GAG AAC AAT AAA GCG
ON2 (UL35kon3)	CTG TGT ACT TCG CTA GTC

Tabelle 4.2 – Oligonuklotide

Oligonukleotide	Sequenz
ON3 (UL35int5)	GTA TAC GCG CTG GAG GCC
ON4 (UL35int3)	GGC TAC CGA GTA GGG CGA
ON5 (UL35s1)	CTA AGC AGC CGC GTC TTA AG
ON6 (UL35s3)	GCA GAG GTA CAC GTT GGC C
ON7 (UL35s3r)	GGC CAA CGT GTA CCT CTG C
ON8 (UL35s4)	CTG GGC TGT TCT GGC ACG CG
ON9 (UL35s5)	GCA CGG CAT TAG CTC CGC GG
ON10 (T7)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
ON11 (Sp6)	GCA TTT AGG TGA CAC TAT AG
ON12 (epm_fwd_UL35_dATG)	TCC GCT CTG GTT TTG GTT TCG TTT TCA AAG GGA GCC CCA TCG CGG CCC AAG GAT CGC GAG CTA GGG ATA ACA GGG TAA TCG ATT T
ON13 (epm_bwd_UL35_dATG)	CGG GCA GTG GCG GGC CCG ATG GGG CTC GCG ATC CTT GGG CCG CGA TGG GGC TCC CTT TGA AAA CGG CCA GTG TTA CAA CCA ATT AAC C
ON14 (epm_fwd_UL35revATG)	GGT TTT GGT TTC GTT TTC AAA GGG AGC CCC ATC ATG GCC CAA GGA TCG CGA GCT AGG GAT AAC AGG GTA ATC GAT TT
ON15 (epm_bwd_UL35revATG)	GGC GGG CCC GAT GGG GCT CGC GAT CCT TGG GCC ATG ATG GGG CTC CCT TTG AAA ACG GCC AGT GTT ACA ACC AAT TAA CC
ON16 (epm_delUL35_fwd)	ATG GCC CAA GGA TCG CGA GCC CCA TCG GGC CCG CCA CTG CCC GTT CTC CTA GGG ATA ACA GGG TAA TCG ATT T

Tabelle 4.2 – Oligonuklotide

Oligonukleotide	Sequenz
ON17 (epm_delUL35_bwd)	GAG ATT CCG TAG GTT TTC GGC CAG ATC GTC CCG CGG GTC TTC GAC GTC GGC CAG TGT TAC AAC CAA TTA ACC

4.4 siRNA

Die verwendeten siRNAs wurden von der Firma Ambion bezogen. Als Negativkontrolle wurde die unspezifische *Negative Control siRNA#1* (Ambion) verwendet.

SNX5 siRNA (s25878)	<i>sense</i>	CGA UAC UAC AUG CUC AAC ATT
	<i>antisense</i>	UGU UGA GCA UGU AGU AUC GGA

4.5 Antikörper

Tabelle 4.3 – sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller/Referenz
Protein-A Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelt		BD Bioscience Pharmingen
anti-Maus-HRP	Ziege	Dianova
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Dianova
anti-Maus-AlexaFluor488	Ziege	Invitrogen
anti-Maus-AlexaFluor586	Ziege	Invitrogen
anti-Kaninchen-AlexaFluor488	Ziege	Invitrogen
anti-Kaninchen-AlexaFluor586	Ziege	Invitrogen
anti-Ziege-HRP	Esel	Dianova

Tabelle 4.4 – primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller/Referenz
mAb anti-FLAG-Tag (M2)	Maus	Sigma-Aldrich
mAb anti-myc-Tag (9E10)	Maus	Evan et al., 1985
mAb anti-CI-M6PR	Maus	Novus Biologicals
mAb anti-GAPDH	Maus	Ambion
mAb anti-gH (14-4B)	Maus	Simpson et al., 1993
mAb anti-gM (IMP91-31)	Maus	Mach et al., 2000
mAb anti-gN (14-16A)	Maus	Britt und Auger, 1985
mAb anti-gpUL55(gB) (27-287)	Maus	Schoppel et al., 1996
mAb anti-ppUL83(pp65) (65-33)	Maus	W. Britt, Department of Pediatrics, University of Alabama
mAb anti-IE1(63-27)	Maus	Andreoni et al., 1989
mAb anti-ppUL82(pp71) (CMV355)	Maus	Nowak et al., 1984
anti-ppUL82(pp71)	Kaninchenserum	M. Winkler, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen
mAb anti- β -Aktin(13E5)	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
anti-SNX5	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnologies
anti-SNX5	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnologies
anti-ppUL35	Kaninchenserum	Liu und Biegalke, 2002
anti-ppUL32(pp150) XP1(VIII)	Kaninchenserum	B. Plachter, Institut für Virologie, Universitätsmedizin Mainz

4.6 Verbrauchsartikel

Pipettenspitzen, gefiltert (20, 200 und 1250 μ l) (Sarstedt)

Petrischalen (10 cm; 3,5 cm Durchmesser) (Sarstedt)

Mikrotiterplatten (96, 48, 24, 6 Kavitäten) (Greiner Bio One)

Mikrotiterplatten, weiß, 96 Kavitäten (Corning)

serologische Pipetten 5, 10 und 25 ml (Greiner Bio One)
 Zellschaber (Greiner Bio One)
 Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm²) (Greiner Bio One)
 Zellkulturschalen (10 cm) (Greiner Bio One)

4.7 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Zelllinien

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), *high glucose* (PAA)
 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (PAA)
 RPMI 1640 ohne Phenolrot (Biochrom)
 Opti-MEM (Gibco)
 Trypsin/EDTA in PBS (Biochrom)
 Penicillin/Streptomycin (PAA)
 fetales Kälberserum (PAA)
 Natriumpyruvat (Gibco)
 MEM-Vitamine (Gibco)
 humanes AB-Serum (Sigma Aldrich)
 nichtessentielle Aminosäuren (Gibco)
 PBS (*phosphate-buffered saline*) (PAA)
 humanes M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) (Orfgenetics)
 humanes EGF (*epidermal growth factor*) (Peprotech)

Transfektionsreagenzien

Lipofectamin LTX (Invitrogen)
 Lipofectamin 2000 (Invitrogen)
 RNAiMax (Invitrogen)

Zelllinien

HeLa (Gey et al., 1952)
 HEK293T (Graham et al., 1977)
 HEK293A (Life Technologies)
 U373MG (Pontén und Macintyre, 1968)

primäre Zellen

HFF (*human foreskin fibroblasts*, humane Vorhaut-Fibroblasten)
 MDM (*monocyte derived macrophages*, Monozyten abgeleitete Makrophagen)

4.8 Virusstämme

HCMV-Virusstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante Viren verwendet, die aus BAC-Konstrukten rekonstituiert wurden. Sie basieren auf TB40E-BAC4 (Sinzger et al., 2009), der aus dem klinischen Isolat TB40/E (Sinzger et al., 1999) hergestellt wurde. Diese Viren sind in der Lage auch Endothelzellen und Makrophagen zu infizieren.

adenovirale Vektoren

Für die Transduktion von humanen Macrophagen wurden adenovirale Vektoren des AdEasy-Systems (He et al., 1998) verwendet.

4.9 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Carl-Roth, Fluka oder Serva bezogen.

Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme und die passenden Reaktionspuffer wurden von der Firma Fermentas bezogen

Immunblot-Detektionsreagenzien

Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate (Thermo) und Femto Maximum sensitive Substrate (Thermo) im Verhältnis 10:1 gemischt.

4.9.1 Reagenzsysteme

Nucleobond AX PC500 Kit für große Plasmid- und BAC-Aufreinigung (Macherey-Nagel)
 Nucleospin PCR Aufreinigungskit (Macherey-Nagel)
 Mutation Generation System (Finnzyme)
 GPS-LS Linker Scanning System (New England Biolabs)
 Beetle-Juice Firefly-Luciferase Kit (PJK)

4.9.2 Pufferlösungen

Soweit nicht anders angegeben, sind die Angaben für einfach konzentrierte Lösungen.

Tabelle 4.5 – Pufferlösungen

Puffer	Zusammensetzung
CoIP-Lysepuffer	50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,5% Nonidet P40; pH 8
CoIP-Waschpuffer	10 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; 300 mM NaCl; 1% Triton X-100; pH 8
Homogenisierungspuffer	20 mM HEPES-KOH; 250 mM Sucrose; 10 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM EGTA; 1 mM DTT
SDS-PAGE-Laufpuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1% SDS
Immunblot-Transferpuffer	4,8 mM Tris; 3 mM Glycin; 0,004% SDS; 10% Methanol
Protein-Ladepuffer (5×)	5% SDS; 5% 2-β-Mercaptoethanol; 50% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau
PCR-Puffer für Kolonie-PCR	(10x) 100 mM TrisHcl; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; 0,01% Gelatine; pH 8,3
DNA-Ladepuffer (6×)	30% Glycerin; 0,2% Xylencyanol; 0,2% Bromphenolblau
LB-Bakterienkulturmedium	5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ pH7,4
RIPA-Puffer	50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 0,5% Natriumdeoxycholat; 1% Triton X-100
Sucrose-Phosphatpuffer (2×)	149,24 g/l Sucrose; 2,346 g/l K ₂ HPO ₄ ; 1,02 g/l KH ₂ PO ₄

4.10 Geräte

Ultrazentrifuge L8-70 (Beckman) mit Rotor SW28

Ultrazentrifuge Optima TLX (Beckman Coulter) mit Rotor TLA 100.3

digitale Chemilumineszenz-Detektionsanlage Intelligent Dark Box LAS 3000 (Fuji Film)

Thermocycler T3000 (Biometra)

Blotkammer Trans-Blot 2D Cell (Biorad)

Elektroporator GenePulser Xcell (Biorad)

FACS Canto II (Becton Dickinson)

Fluoreszenzmikroskop IX 81 mit MT10 Lichtquelle (Olympus)

Sonicator W220F mit Microtip (Heat Systems-Ultrasonics)

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Plasmid-DNA-Präparation

Die kleine Plasmid-Präparation wurde nach der Methode von Zagursky et al. (1985) durchgeführt. Plasmid-Präparation in großem Maßstab wurde mittels Nucleobond PC 500-Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

5.1.2 DNA-Sequenzierung

Nukleotidsequenzierungen von Plasmiden und BACs wurden mittels Sanger-Kettenabbruchsynthese mit dem BigDye-Kit Version 1.1 (Applied Biosystems) am Institut für Klinische Molekularbiologie in Kiel durchgeführt. Die Chromatogramme wurden mit dem Programm Vector NTI (Invitrogen) ausgewertet.

5.1.3 Mutation des HCMV-Genoms im künstlichen bakteriellen Genom

Für die Vermehrung und Manipulation des HCMV Genoms wurden künstliche bakterielle Chromosomen (*bacterial artificial chromosomes*, BACs) verwendet. Diese Plasmide mit einer Kapazität bis zu 300 kb wurden aus dem Mini-F-Plasmid abgeleitet und enthalten das gesamte HCMV Genom (Ruzsics und Koszinowski, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde das HCMV TB40E-BAC4 (Sinzger et al., 2009) verwendet. Zum Einbringen von Mutationen wurde ein leicht verändertes Verfahren zur rückstandsfreien homologen Rekombination (Tischer et al., 2006) verwendet. Im ersten Schritt wird durch homologe Rekombination ein PCR-Produkt der Kanamycinresistenzkassette mit flankierenden Sequenzen des viralen Zielgens und einer *I-SceI* Restriktionsschnittstelle in das BAC eingesetzt. Während des zweiten Schritts wird ein DNA-Doppelstrangbruch durch *I-SceI* induziert und die Resistenzkassette aus dem BAC entfernt. Je nach Gestaltung der PCR-Oligonukleotide und des PCR-Produkts können einzelne Basen mutiert sein, Gene deletiert oder fluoreszierende Proteine oder Epitopmarkierungen angefügt werden.

Herstellen von elektrokompenten Bakterien für die erste Rekombination

Das HCMV-BAC TB40E BAC4 liegt in E.coli DH10B gemeinsam mit dem Plasmid

pKD46S vor, welches für die Red-Rekombinasen α , β , γ unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors kodiert. Aufgrund eines temperaturabhängigen Replikationsstartpunkts wird das Plasmid bei 30 °C repliziert, jedoch nicht bei Temperaturen höher als 37 °C (Hashimoto-Gotoh et al., 1981). Des Weiteren besitzt pKD46S eine Expressionskassette für die Homing-Endonuklease *I-SceI* unter Kontrolle eines Tetracyclin-abhängigen Promotors. Von einer Übernachtskultur *E.coli* TB40E-BAC4/pKD46S in LB-Medium mit Chloramphenicol und Ampicillin (LB/Cm/Amp) wurde 500 μ l in 50 ml verdünnt und für 1,5 h bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte (OD 600 nm) von 0,15 inkubiert. Bei Erreichen der optischen Dichte wurde die Expression der Rekombinasen durch 0,1% L-Arabinose induziert. Nach einer Stunde Induktion wurden die Bakterien für 20 Minuten auf Eis gekühlt, bei 3500 rpm, 4 °C, 10 Minuten sedimentiert und anschließend in sterilem H₂O bidest resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Bakterien in 10 ml eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert und wieder sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und die im Zentrifugenröhrchen zurückbleibende Flüssigkeit zum Resuspendieren der Bakterien genutzt. Die Bakteriensuspension wurde in Ansätze zu je 100 μ l aufgeteilt und bei –80 °C gelagert.

Erstellen des PCR-Produkts für die homologe Rekombination

Für die erste homologe Rekombination wurde die Kanamycinresistenz-Kassette KanR mit den spezifischen Oligonukleotiden vom Plasmid pEP-KanS2 amplifiziert. Das PCR-Produkt enthielt flankierend zur *KanR*-Kassette die homologen Sequenzen definierter HCMV-BAC-Sequenzen und am 5'-Ende der *KanR*-Kassette eine *I-SceI* Restriktionsschnittstelle. Für die PCR Reaktion wurden 20 ng pEP-KanS2; 1 μ l 25 mM dNTP-Mix; 4 μ l 25 mM MgCl₂; jeweils 0,5 μ l der spezifischen Oligonukleotide; 2 μ l Taq-DNA-Polymerase und 5 μ l 10x PCR-Puffer eingesetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l aufgefüllt. Als erster Schritt des PCR-Programms wurden die PCR-Ansätze in einem PCR-Thermocycler für 2 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend in 34 Zyklen mit 30 s bei 95 °C, 30 s bei 55 °C und 2 Minuten bei 72 °C amplifiziert. Das Programm wurde abgeschlossen durch eine fünfminütige Inkubation bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden mittels 1% Agarosegel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und mit einem PCR-Aufreinigungskit (Machery -Nagel) mit 10 μ l Puffer eluiert.

1.Rekombination

Für die Elektroporation wurden 5 μ l PCR-Produkt mit 50 μ l kompetenten Bakterien gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette (4 mm Spaltbreite) überführt. Die Parameter für die Elektroporation betrugen 2500 Volt, 200 Ω und 25 μ F. Nach

der Elektroporation wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben, die Bakterien in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Auf eine LB-Agar-Platte mit Chloramphenicol und Kanamycin wurden 100 µl Bakteriensuspension ausgestrichen, die restliche Suspension auf einer weiteren LB-Agar-Platte ausgestrichen und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Bakterien-Kolonien wurden durch Kolonie-PCR auf Insertion der *KanR*-Kassette charakterisiert. Dazu wurden die Oligonukleotide ON1 und ON6 verwendet, deren Bindestellen außerhalb des für die Rekombination verwendeten Bereichs lagen.

2.Rekombination

Positive Kolonien wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Chloramphenicol und Kanamycin bei 30 °C inkubiert. Je 1 ml Übernachtskultur wurden in LB-Medium mit Chloramphenicol, Ampicillin, Anhydro-Tetracyclin und 0,1% L-Arabinose überführt und 5 Stunden inkubiert und anschließend 10 µl auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Durch Kolonie-PCR wurden die Kolonien auf die *KanR*-Kassette überprüft. Aus negativen Kolonien wurde das UL35-Gen amplifiziert und mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Kolonien, welche die gewünschte Mutation aufwiesen, wurden über Nacht in LB-Medium mit Chloramphenicol bei 42 °C inkubiert und anschließend auf LB-Agar-Chloramphenicol-Platten ausgestrichen, um die Replikation des Plasmids pKD46S zu inhibieren und Kolonien ohne pKD46S zu erhalten.

Tabelle 5.1 – Für Mutation von HCMV TB40E BAC4 durchgeführte Schritte

BAC -Mutante	Schritte
TB40EdUL35	<ul style="list-style-type: none"> • PCR-Produkt für 1. Rekombination aus ON12, ON13 und pEP-KanS2 • eingefügt in TB40E BAC4 • nach 2. Rekombination erstes Startcodon von UL35 mutiert
TB40EdUL35Rev	<ul style="list-style-type: none"> • PCR-Produkt für 1. Rekombination aus ON14, ON15 und pEP-KanS2 • eingefügt in TB40E BAC4 • nach 2. Rekombination erstes Startcodon von UL35 wiederhergestellt
TB40EdelUL35	<ul style="list-style-type: none"> • PCR-Produkt für 1. Rekombination aus ON16, ON17 und pEP-KanS2 • eingefügt in TB40E BAC4 • nach 2. Rekombination UL35 durch <i>KanR</i> ersetzt, flankiert von je 50 Basenpaaren von UL35
TB40EdUL35A	<ul style="list-style-type: none"> • Restriktionsenzymverdau von Plasmid pcDNA3-UL35Ad3ATG • Elektroporation von UL35Ad3ATG in TB40EdelUL35 • Ersetzen von <i>KanR</i> durch UL35Ad3ATG-Fragment • UL35 wiederhergestellt mit mutierten alternativen Startcodons für UL35A
TB40EUL35Tn71	<ul style="list-style-type: none"> • Restriktionsenzymverdau von Plasmid pcDNA3-UL35Tn71 • Elektroporation von UL35Tn71 in TB40EdelUL35 • Ersetzen von <i>KanR</i> durch UL35Tn71-Fragment • UL35 wiederhergestellt mit mutierter SNX5 Bindestelle
TB40EdelUL35rev	<ul style="list-style-type: none"> • Restriktionsenzymverdau von Plasmid pcDNA3-UL35 • Elektroporation von UL35-Fragment in TB40EdelUL35 • Ersetzen von <i>KanR</i> durch UL35 • UL35 wiederhergestellt

5.2 Protein-Techniken

5.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden SE250-Elektrophoreseeinheiten (Amersham Bioscience) verwendet. Laufpuffer und Polyacrylamid-Gele wurden nach Sambrook und Russell (2000) angesetzt.

5.2.2 Koimmunpräzipitation

In eine 6-Kavitäten-Platte wurden je Vertiefung $2,5 \times 10^5$ HEK293T-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation mit 1 µg DNA je Plasmid transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 500 µl PBS abgespült und sedimentiert. Die Zellen wurden in 500 µl CoIP-Lysepuffer resuspendiert und 20 Minuten bei 4 °C lysiert. Genomische DNA und unlösliche Zelltrümmer wurden bei 13.300 rpm für 30 Minuten bei 4 °C abgetrennt und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Für die Lysatkontrolle wurden 80 µl Lysat mit 20 µl 5× SDS-Ladepuffer vermischt und bei −30 °C gelagert. Je 500 µl Lysat wurden für einen CoIP-Ansatz verwendet. Für die CoIP wurden je Ansatz 50 µl Protein-G-Sepharose (GE-Healthcare) zweimal mit Lysepuffer gewaschen und in Lysepuffer mit 5% Gelatine aus der Haut von Kaltwasserfischen (Sigma-Aldrich) bei 4 °C auf einem Überkopfmischer 1 - 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Protein-G-Sepharose mit 1 µg Antikörper bzw. 1 ml Hybridomüberstand für die Präzipitation bzw. mit unspezifischem Antikörper für die Negativkontrolle für 1 - 2 Stunden bei 4 °C auf einem Überkopfmischer inkubiert und danach zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Für die CoIP wurden 500 µl Lysat mit 40 µl vorbereiteter Protein-G-Sepharose-Suspension vermischt und 10 Minuten auf einem Überkopfmischer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze achtmal mit Waschpuffer gewaschen und in 10 µl 2× SDS-Ladepuffer eluiert. Das Eluat wurde auf einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die kopräzipitierten Proteine mittels Immunfärbung nachgewiesen.

5.2.3 Immunblot

Die Zelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (ImmobilonP, Milipore) übertragen. Die Membran wurde für eine Stunde mit Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver/0,5% Tween20/PBS) inkubiert und anschließend mit dem Primärantikörper in Blockierungspuffer für eine Stunde inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit PBS und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde.

Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Membran wurde mit Chemilumineszenz-Reaktionssubstrat (Thermo) überschichtet und das Signal in der digitalen Dokumentationsanlage LAS-3000 (Fuji-Film) detektiert.

5.2.4 Zellfraktionierung

In Gewebekulturschälchen (Durchmesser 10 cm) wurden 2×10^6 HEK293T-Zellen je Schale ausgesät und mit 6 µg der jeweiligen Plasmide transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit eiskaltem PBS abgespült und sedimentiert. Die Zellen wurden in 3 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellyse erfolgte durch Ultraschall (3×10 s, mit 5 Minuten Unterbrechung auf Eis). Intakte Zellen, Zellkerne und größere Zelltrümmer wurden bei $800 \times g$ und 4 °C für 15 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde in 3 ml-Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer, dickwandig, Beckman Coulter) überführt und bei $50.000 \times g$ und 4 °C für 50 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde als cytosolische Fraktion abgenommen und bei –80 °C gelagert. Das Sediment stellt die Membranfraktion dar und wurde in RIPA-Puffer gelöst. Der Proteingehalt wurde mittels Bradford-Verfahren (Quickstart Bradford Dye Reagent 1×, Biorad) bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Immunfärbung nachgewiesen.

5.3 Zellkultur-Techniken

5.3.1 Zellkultur

HEK293T-, HeLa-, U373MG- und HFF-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FKS, Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin kultiviert. MDMs wurden in RPMI 1640 Medium mit 4% humanem AB-Serum, Penicillin/Streptomycin, L-Gluthamin, Natriumpyruvat, nicht essentiellen Aminosäuren und $0,4 \times$ MEM-Vitaminen kultiviert

5.3.2 Makropinozytosexperimente

In 6-Kavitäten-Platten wurden 3×10^5 HeLa-Zellen je Kavität ausgesät und mit je 1,25 µg Plasmid mit Lipofectamin LTX nach Angaben des Herstellers transfiziert. 30 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit DMEM Medium ohne FKS, Glutamin und Penicillin/Streptomycin überschichtet und für weitere 12 Stunden über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 100 µg/ml FITC-Dextran (durchschnittliches Molekülgewicht: 70 kDa) und 100 ng/ml EGF

für drei Minuten stimuliert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA bei 4 °C abgelöst und in 2% PFA/PBS fixiert. Die zelluläre Aufnahme des FITC-Dextran wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit FITC-Dextran ohne EGF inkubiert wurden.

5.3.3 Gewinnung von Monozyten abgeleiteten Makrophagen

Spenderblut aus der Thrombozytenspende wurde 1:1 mit PBS gemischt, geschüttelt und je 30 ml auf 15 ml Biocoll Trennlösung (Biochrom) geschichtet. Dieses System wurde bei $960 \times g$, niedrigster Beschleunigung und ohne Bremse für 35 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde abgenommen, auf zwei 50 ml-Röhrchen aufgeteilt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und mit Bremse bei $470 \times g$ 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 35 ml PBS gewaschen und bei $350 \times g$ sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 10 ml MDM-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. In unbeschichtete Kunststoff-Petrischalen wurden 5×10^6 - 8×10^6 Zellen in 10 ml MDM Medium ausgesät. Zur Differenzierung wurde 100 ng/ml humanes M-CSF (*Macrophage colony stimulating factor*) hinzu gegeben. Nach drei Tagen Inkubation wurden der Überstand verworfen, die adhärennten Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für weitere vier Tage inkubiert.

5.3.4 Makropinozytosexperimente mit humanen Makrophagen

Monozyten-abgeleitete-Makrophagen (MDM) in 35 mm-Petrischalen wurden in MDM-Medium ohne Phenolrot kultiviert. Die MDMs wurden mit 25 μ M Alexa647 in Kulturmedium überschichtet und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, bzw. als Negativkontrolle bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit kaltem Paraformaldehyd (2% in PBS) fixiert. Die Aufnahme von Alexa647 wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen

5.4 Virus-Techniken

5.4.1 HCMV-Replikationskinetik

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Virusreplikation wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Kavität in einer 48-Kavitäten-Platte ausgesät und mit MOI 1 infiziert. Die Platten wurden bei $2000 \times g$ für 30 Minuten zentrifugiert und 3 Stunden im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml Zellkulturmedium überschichtet. Nach 1, 3, 5, 7, 9, 11 und

13 Tagen wurden von jeweils 0,5 ml Zellkulturmedium von einer Kavität entnommen und die Zelltrümmer bei 8000 rpm für 5 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert. Abschließend wurden die Virustiter der Überstände bestimmt.

5.4.2 HCMV-Titration

In eine Mikrotiterplatte wurden 1×10^4 HFF-Zellen pro Ansatz in 100 μl Medium ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Vom virushaltigen Zellkulturmedium wurden serielle 1:10 Verdünnungen mit einem Endvolumen von 500 μl angelegt. 100 μl der Verdünnungen wurden zu den ausgesäten HFF gegeben und für 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 5 Minuten bei -20°C fixiert. Das Methanol wurde abgesaugt und die Platten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit PBS rehydriert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Zum Färben der infizierten Zellen wurden 50 μl des monoklonalen Antikörpers 63-27 (Maus anti-IE1) hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 50 μl des Sekundäranantikörpers Ziege-anti-Maus-HRP in 1% BSA/PBS für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit 100 μl Färbelösung (eine AEC-Tablette in 4 ml DMF gelöst, 16 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5), 30 μl Wasserstoffperoxid) überschichtet. Die Mikrotiterplatten wurden für 5 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, die Färbelösung abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Mittels Durchlichtmikroskopie wurden die positiven Zellkerne gezählt. Aus Anzahl positiver Kerne und Verdünnungsstufe wurde der Virustiter in pfu/ml berechnet.

5.4.3 HCMV-Rekonstitution

Für die Elektroporation wurde BAC-DNA aus einer 200 ml Kultur mit einem Plasmid-DNA-Maxipräparationskit (Machery-Nagel) isoliert und in 100 μl H_2O *bidest* rekonstituiert. 4×10^6 HFF-Zellen wurden in 100 μl DMEM-Medium aufgenommen und mit 50 μl des BACs und 4 μg pCMV71 vermischt und in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 10 mm) gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 280 V, 1500 μF und unbegrenztem Widerstand. Anschließend wurden die Zellen in eine 75 cm^2 -Zellkulturflasche mit 15 ml Kulturmedium überführt. Ein Tag nach der Elektroporation wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden regelmäßig auf die Bildung von zytopathischen Effekten (CPE) untersucht. Nach Erreichen eines CPE von 100% wurde der Überstand abgenommen, bei -80°C gelagert und für weitere Infektionsversuche verwendet.

5.4.4 Präparation von zellfreien HCMV-Partikeln

In einer 25 cm²-Zellkulturflaschen wurden HFF mit HCMV infiziert. Nach Erreichen von 90% infizierten Zellen wurden die HFF abgelöst, mit 1×10^7 abgelösten, nicht infizierten HFF-Zellen vermischt und auf fünf 175 cm²-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Zellen wurden bis zur Lyse kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde gesammelt und die Zelltrümmer bei $2500 \times g$ für fünf Minuten abgetrennt. Der Überstand wurde in sterile Zentrifugenröhrchen überführt. Die Viruspartikel wurden bei 28.000 rpm in einem SW28-Rotor für eine Stunde und zehn Minuten bei 15 °C in einer L8-70 Ultrazentrifuge (Beckman) abgetrennt. Der Überstand wurde dekantiert und die Viren bei 4 °C für drei bis vier Stunden in dem verbleibenden Überstand resuspendiert. Die Virionen wurden im gleichen Verhältnis mit Sucrose-Phosphatpuffer gemischt und in Probenvolumen von 200 µl aufgeteilt und bei –80 °C gelagert.

5.4.5 Rekonstitution von Adenoviren

Die Plasmid-DNA des adenoviralen Vektors wurde mit dem Restriktionsenzym *PacI* linearisiert, auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit dem Nucleospin PCR-Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt. In eine 25 cm²-Zellkulturflasche wurden 3×10^5 HEK 293A-Zellen ausgesät und mit 4 µg des linearisierten Vektors transfiziert. Die Zellen wurden regelmäßig auf Expression von GFP untersucht.

5.4.6 Präparation von zellfreien Adenoviren

Zellkulturüberstand und infizierte Zellen wurden mit nicht infizierten HEK 293A-Zellen in einer 175 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Nach sieben bis zehn Tagen wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS abgespült und sedimentiert. Die Zellen wurden in 0,5 ml Medium resuspendiert und durch vier Gefrier-und-Tau-Zyklen in einem Ethanol-Trockeneisbad aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden sedimentiert und der Überstand bei –80 °C gelagert.

5.4.7 Titration von Adenoviren

In einer 96-Mikrotiterplatte wurden 1×10^4 HeLa-Zellen pro Ansatz ausgesät und am nächsten Tag mit seriellen zehnfachen Verdünnungen der Adenoviruspräparation infiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 4% PFA/PBS fixiert, die Zellkerne mit DAPI gefärbt, die GFP-positiven Zellen gezählt und der Virustiter in pfu/ml berechnet. Niedrige Viruspassagen ergaben Titer zwischen 1×10^7 - 1×10^9 pfu/ml.

5.4.8 Infektion von humanen Makrophagen mit Adenoviren

Mit humanem M-CSF differenzierte MDMs wurden in Petrischalen (Durchmesser: 6 cm) ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die MDMs mit Adenoviren (MOI 10) in 500 µl Wachstumsmedium überschichtet. Die Petrischalen wurden vier Stunden auf einem Wipp-Schüttler in einem CO₂-Inkubator inkubiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit MDM-Medium ohne Phenolrot weiter kultiviert. Vier Tage nach der Infektion wurden die Aufnahmeexperimente durchgeführt.

5.4.9 Transfektion von siRNA

Für die Transfektion von siRNA wurde das Transfektionsreagenz RNAiMAX (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Für eine 24-Kavitäten-Platte wurden 20 pmol siRNA je Ansatz, für eine 48-Kavitäten-Platte wurden 12 pmol je Ansatz und für 6-well-Platte 50 pmol siRNA je Ansatz verwendet.

5.4.10 Luciferase-Reporter-Experimente

In 6-well-Platten wurden $2,5 \times 10^6$ U373MG-Zellen pro Kavität ausgesät und am folgenden Tag mit 0,8 µg Aktivator-Plasmid-DNA und 0,2 µg Reporter-Plasmid-DNA (pM287) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin LTX (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Zwei Tage nach Transfektion wurde das Wachstumsmedium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit 400 µl *Passive Lysis Buffer* (Promega) überschichtet und 30 Minuten auf einem Schüttler lysiert. Je 50 µl des Überstands wurde in weiße Mikrotiterplatten überführt und unter Zugabe von 50 µl *Beetle Juice* (PJK) in einem Luminometer (Berthold Technologies) gemessen.

5.4.11 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Auf sterilen Deckgläschen wurden Zellen ausgesät und am folgenden Tag transfiziert bzw. infiziert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS für zehn Minuten fixiert. Die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für fünf Minuten mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert, gefolgt von drei Waschrufen mit PBS. Die Sättigung unspezifischer Bindestellen erfolgte durch Inkubation mit 10% FKS in PBS für 30 Minuten. Die Anfärbung mit dem Primärantikörper erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C. Anschließend folgten drei Waschrufen mit PBS und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei 37 °C für 30 Minuten. Die Deckgläschen wurden dreimal gewaschen und mit VectaShield Mounting Medium mit DAPI (Vector Labs) auf Objektträgern fixiert.

5.4.12 Herstellerregister

Die Hersteller-Standorte der verwendeten Produkte werden hier einmalig in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

◊ Ambion/Life Technologies Corporation (Carlsbad, Kalifornien, USA) ◊ Applied Biosystems/Life Technologies Corporation (Carlsbad, Kalifornien, USA) ◊ Amersham Bioscience (Amersham, Großbritannien) ◊ Becton und Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA) ◊ Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA) ◊ Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland) ◊ Biochrom (Berlin; Deutschland) ◊ Biomern.net (Ulm, Deutschland) ◊ Biometra (Göttingen, Deutschland) ◊ Bio-Rad Laboratories (Hercules, Kalifornien, USA) ◊ Carl Roth GmbH+CoKG (Karlsruhe, Deutschland) ◊ Cell Signaling Technologies (Beverly, Massachusetts, USA) ◊ Corning (Corning, New York, USA) ◊ Dianova (Hamburg, Deutschland) ◊ Finnzymes (Espoo, Finnland) ◊ Fluka (Buchs, Schweiz) ◊ Fujifilm (Tokio, Japan) ◊ GE-Healthcare (Chalfont St. Giles, Großbritannien) ◊ Gibco/Life Technologies Corporation (Carlsbad, Kalifornien, USA) ◊ Greiner Bio-One (Frickenhäusen, Deutschland) ◊ Heat systems Ultra Sonics (Plainview, New York, USA, Firma existiert nicht mehr) ◊ Invitrogen/Life Technologies Corporation (Carlsbad, Kalifornien, USA) ◊ Machery–Nagel (Düren, Deutschland) ◊ Merck (Schwalbach am Taunus, Deutschland) ◊ Merck Milipore (Billerica, Massachusetts, USA) ◊ Novus Biologicals (Littleton, Colorado, USA) ◊ Olympus Life Science (Hamburg, Deutschland) ◊ Orf genetics (Kopavogur, Island) ◊ Peprotech (Hamburg, Deutschland) ◊ PJK (Kleinblittersdorf, Deutschland) ◊ Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA) ◊ PAA (Cölbe, Deutschland) ◊ Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA) ◊ Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) ◊ Serva (Heidelberg, Deutschland) ◊ Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) ◊ Thermo Scientific (Idstein, Deutschland) ◊ Vector Labs (Burlingame, Kalifornien, USA)

6 Ergebnisse

6.1 Sorting Nexin 5 interagiert mit ppUL35 und ppUL35A

Die Funktion des Tegumentproteins ppUL35 und dessen kürzerer Form ppUL35A ist bis heute noch nicht genau aufgeklärt. Mit Hilfe eines *Yeast-Two-Hybrid-Screens* konnten verschiedene zelluläre Proteine identifiziert werden, die mit ppUL35 interagieren (M. Winkler, unveröffentlicht). Diese Proteine haben Funktionen in intrazellulären Transportprozessen, der Regulation von Apoptose, der NF- κ B Signaltransduktion und der Transkription. In Tabelle 6.1 sind die aussichtsreichen Proteine, die mehrmals im Yeast-Two-Hybrid-Screen identifiziert wurden, aufgeführt. In der vorliegenden Arbeit sollten

Tabelle 6.1 – In Yeast-Two-Hybrid Screen identifizierte Interaktoren von ppUL35.

Protein	Funktion	Referenz
CIAPIN1 (<i>Cytokine independent apoptosis inhibitor</i>)/Anamorsin1	Apoptose-Inhibitor, Zellproliferation	Shibayama et al., 2004
IKIP (<i>IKK interacting Protein</i>)	pro-apoptotische Aktivität	Hofer-Warbinek et al., 2004
RED (IK-Cytokin)	notwendig für die Lokalisierung von MAD1 am Kinetochor, Aktivierung des Spindel-Checkpunkts	Yeh et al., 2012 Assier et al., 1999
SNX5 (Sorting Nexin 5)	Retromer-Komponente, retrograder Transport	Wassmer et al., 2007
TRAIP <i>TRAF-interacting protein</i>	Inhibitor der TNF- α -vermittelten Aktivierung von NF- κ B, Regulation der Zellproliferation	Lee et al., 1997 Besse et al., 2007 Almeida et al., 2010
DP97-Helikase (DEAD-Box-DNA/RNA-Helikase)	Regulation der transaktivierenden Aktivität von nukleären Rezeptoren	Rajendran et al., 2003
Karyopherin β 1/Importin 1	Erkennung von Aminosäure-Signalsequenzen für den Kerntransport	Chook and Süel, 2011

diese Interaktionen verifiziert und funktionell untersucht werden. Als erster Schritt wurde RNA aus humanen Fibroblasten isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA transkribiert. Anschließend wurde die cDNA für CIAPIN1, RED und TRAIP mittels PCR amplifiziert, mit Endonukleasen verdaut und in den pENTR-3C Vektor (Invitrogen) kloniert. Die DNA-Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Mittels Gateway-Rekombination (Invitrogen) wurde die jeweilige Expressionskassette in den Expressionsvektor pDEST-515 für die Expression von FLAG-Fusionskonstrukten überführt. Zur Validierung der Ergebnisse aus dem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* wurde die Interaktion mehrere Interaktionspartner mit ppUL35 in humanen Zellen mittels Koimmunpräzipitation untersucht. HEK-293T Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für das jeweilige zelluläre Protein und dem Expressionsvektor für ppUL35 bzw. ppUL35A kotransfiziert. Aus dem Lysat wurden die zellulären Proteine präzipitiert, das Eluat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunblot ppUL35A bzw. ppUL35 nachgewiesen (Abb. 6.1). Für die Präzipitation wurde der monoklonale Antikörper gegen das FLAG-Peptid (M2) verwendet. Als Negativkontrolle wurde der monoklonale Antikörper gegen das myc-Epitop (9E10) verwendet. Der Immunblot zeigte, dass ppUL35 mit FLAG-CIAPIN1 und FLAG-Sorting Nexin 5 mit anti-FLAG-Antikörper kopräzipitiert wurde. ppUL35A wurde mit FLAG-Sorting Nexin 5 kopräzipitiert, wohingegen ppUL35A mit FLAG-CIAPIN1 nicht kopräzipitiert wurde. Es erfolgte keine Kopräzipitation mit Kontrollantikörper, dies schließt eine Kreuzreaktion aus. Vorläufige Daten zeigten, dass ppUL35 auch mit FLAG-RED und FLAG-TRAIP präzipitiert wurden, ppUL35A jedoch nicht (Daten nicht gezeigt).

Für RED, TRAIP und CIAPIN1 konnte bisher keine eindeutige Funktion beschrieben werden. Für Sorting Nexin 5 (SNX5) gibt es Belege, dass es als Teil des Retromerkomplexes an intrazellulärer Vesikelsortierung und Makropinozytose beteiligt ist. SNX5 hat eine Molekularmasse von 43 kDa und besteht aus einer N-terminalen Phox- und einer BAR-Domäne am C-Terminus. Die BAR-Domäne besteht aus einer *coiled-coil*-Struktur, die aus 3 Helices gebildet wird. Zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne von SNX5 wurden die verkürzten SNX5-Mutanten PX (Aminosäure 1-168), H1 (AS 1-261), H2 (AS 1-343) verwendet (Abb. 6.2A). Die PX-Mutante entspricht der PX-Domäne, H1 entspricht der PX-Domäne und der angrenzenden ersten Helix der BAR-Domäne und H2 entspricht der PX-Domäne zuzüglich der beiden ersten Helices der BAR-Domäne. Die BAR-Domäne konnte nicht in löslicher Form exprimiert werden. Die SNX5-Mutanten wurden mit ppUL35 in HEK-293T Zellen kotransfiziert und in einer Koimmunpräzipitation mit FLAG-Antikörpern präzipitiert. ppUL35 wurde mittels Immunblot nachgewiesen (Abb. 6.2B). Der Immunblot zeigte eine spezifische ppUL35-Bande bei der Koimmunpräzipitation mit

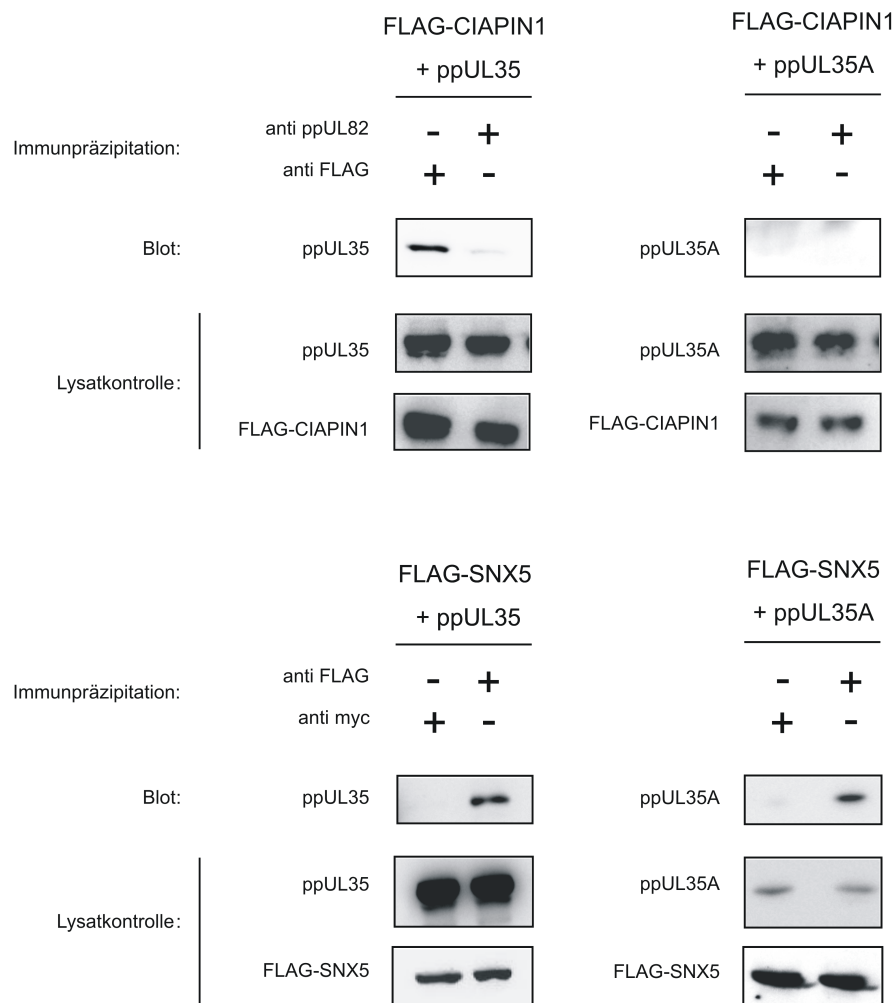


Abbildung 6.1 – Koimmunpräzipitation von FLAG-CIAPIN1 und FLAG-SNX5 mit ppUL35 und ppUL35A. Aus Lysaten von transient transfizierten HEK 293T-Zellen wurde mit mAb M2 (anti-FLAG) FLAG-CIAPIN1 bzw. FLAG-SNX5 präzipitiert und die Kopräzipitation von ppUL35 bzw. ppUL35A mittels Immunblot und Immunfärbung mit Antiserum gegen ppUL35 nachgewiesen. Als Negativ-Kontrollen dienten unspezifische Antikörper gegen ppUL82 (mAb CMV355) bzw. myc-Peptid (mAb M2)

der H1- und der H2-Mutante. Für die PX-Mutante konnte keine Kopräzipitation von ppUL35 nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die verantwortliche Domäne für die Interaktion mit ppUL35 zwischen den Aminosäuren 168 und 261 liegt und ppUL35 mit der ersten Helix der BAR-Domäne interagiert.

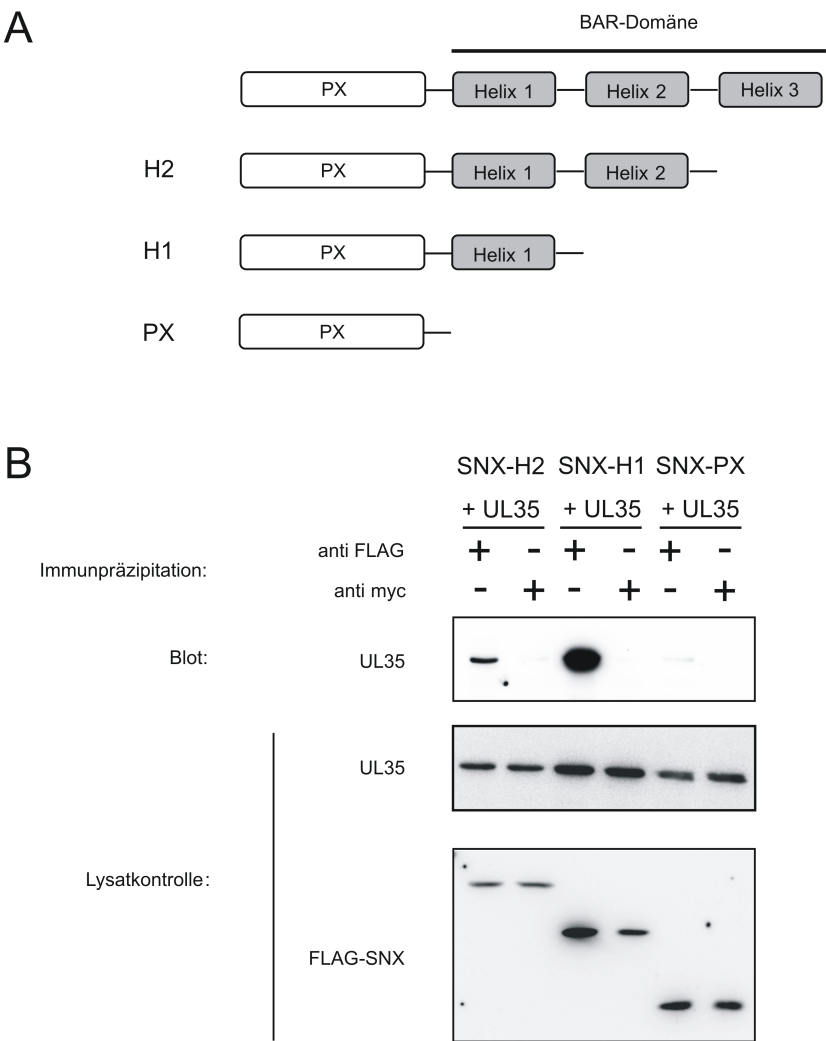


Abbildung 6.2 – Kartierung der Interaktionsdomäne von SNX5 mit ppUL35.
(A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von SNX5 und der verkürzten SNX5-Konstrukte. (B) Koimmunpräzipitation der FLAG-SNX5-Konstrukte aus transfizierten HEK 293T Zellen. Die Koimmunpräzipitation erfolgte mit einem Antikörper gegen das FLAG-Peptid (mAb M2) bzw. als Kontrolle gegen das myc-Peptid (mAb 9E10). Der Immunblot wurde mit Antiserum gegen ppUL35 gefärbt.

6.2 Die Membranassoziation von Sorting Nexin 5 bleibt bei Interaktion mit ppUL35 oder ppUL35A unverändert

Da ppUL35 an die Membran-bindende BAR-Domäne von SNX5 bindet, sollte die Auswirkung dieser Protein-Protein-Interaktion auf die Membranassoziation von SNX5 untersucht werden. HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden für die Expression von FLAG-SNX5 und UL35 bzw. UL35A transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit FLAG-SNX5-Plasmid oder mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert wurden. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet.

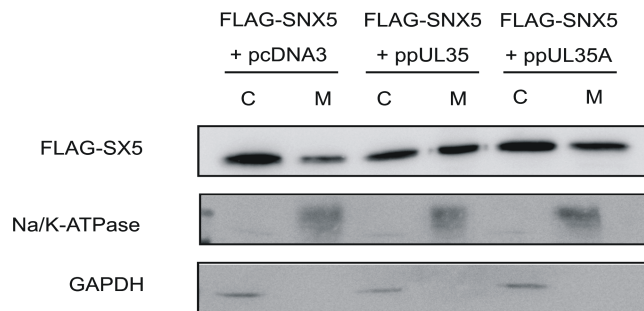


Abbildung 6.3 – Auswirkung von ppUL35 und ppUL35A auf die Membranlokalisation von SNX5. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für FLAG-SNX5 und ppUL35, ppUL35A bzw. Leervektor (pcDNA3) transfiziert. Jeweils 10 µg der Cytosol- (C) und Membranfraktion (M) wurden auf einem 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Der Immunblot wurde mit FLAG-Antikörpern gefärbt. Als Kontrolle für die Membranfraktionen diente ein Antikörper gegen Na/K-ATPase und als Kontrolle für die cytosolischen Fraktionen diente ein Antikörper gegen GAPDH.

Nach Resuspension in Homogenisationspuffer, 30 minütiger Inkubation auf Eis und Lyse mit Ultraschall wurden Zellkerne und große Zelltrümmer abgetrennt. Die Membranfraktion wurde mittels Ultrazentrifugation sedimentiert und der Überstand als cytosolische Fraktion gewonnen. Gleiche Mengen an Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (Abb. 6.3A). Die Färbung erfolgte mittels Antikörper gegen das FLAG-Peptid, die Na/K-ATPase als Kontrolle für die Membranfraktion und gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrolle für die cytosolische Fraktion. Die Ko-Expression von ppUL35 bzw. ppUL35a hat daher keine Auswirkung auf die Bindung von SNX5 an endosomalen Membranen.

6.3 ppUL35 und ppUL35A inhibieren die EGF-stimulierte Makropinozytose

Sorting Nexin 5 hat eine regulierende Funktion in der Makropinozytose (Lim et al., 2008). Bei Überexpression von SNX5 in HEK-FlipIn Zellen konnte eine Erhöhung der Aufnahme von FITC-Dextran nach EGF-Stimulation und damit eine Erhöhung der Makropinozytoseaktivität nachgewiesen werden (Lim et al., 2008). Um einen funktionellen Einfluss der Interaktion von ppUL35 und ppUL35A mit SNX5 zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit UL35 und UL35A mit FLAG-SNX5 kotransfiziert und mit epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und FITC-Dextran für 3 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, fixiert und die Aufnahme von FITC-Dextran mittels Durchflusszytometer analysiert (Abb. 6.4).

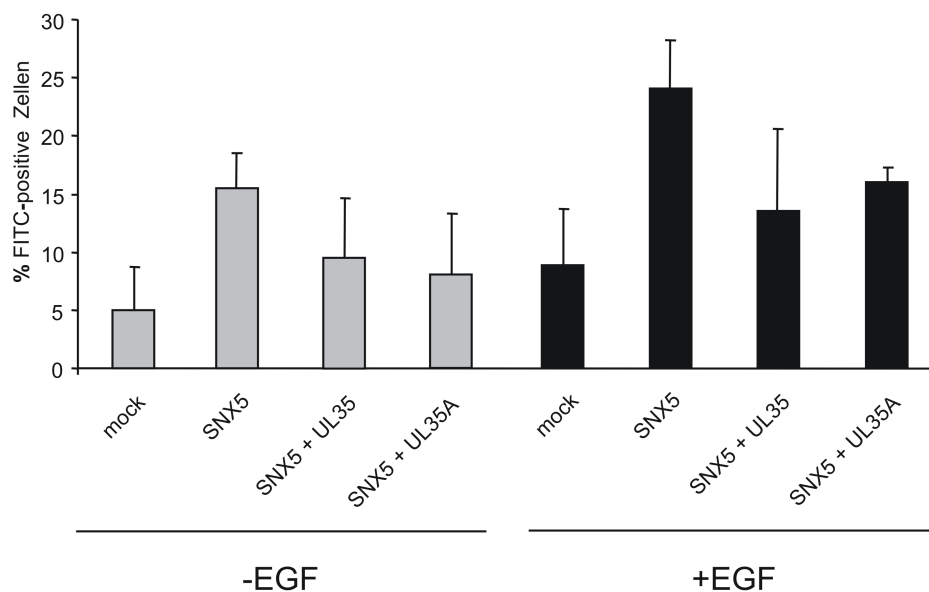


Abbildung 6.4 – EGF-stimulierte Aufnahme von FITC-Dextran. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für SNX5, ppUL35, ppUL35A und Leervektoren kotransfiziert. Die Zellen wurden mit FITC-Dextran inkubiert und die Makropinozytose mit EGF stimuliert. Inkubation ohne EGF diente als Kontrolle. Die Aufnahme von FITC-Dextran wurde mittels Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Als Kontrollen dienten untransfizierte HeLa-Zellen mit und ohne EGF-Stimulation. Generell wiesen die HeLa-Zellen nach EGF-Stimulation eine höhere Aufnahme von FITC-Dextran als ohne EGF-Stimulation auf. Die erhöhte Aufnahme von FITC-Dextran in

SNX5-transfizierte Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen ist auf eine erhöhte basale Makropinocytose durch die Überexpression von SNX5 zurückzuführen. HeLa-Zellen, die sowohl SNX5 als auch UL35 überexprimierten, wiesen eine verringerte Aufnahme von FITC-Dextran nach EGF-Stimulation auf. Für HeLa-Zellen, die SNX5 und UL35A überexprimierten, ergab sich ein ähnliches Bild. Zusammenfassend zeigten Zellen, die eine der beiden UL35 Proteinformen exprimierten, eine reduzierte Makropinozytoseaktivität.

6.4 Die Makropinozytose in humanen Makrophagen wird nicht durch ppUL35 oder ppUL35A inhibiert

Makrophagen weisen eine hohe Endozytoserate und eine hohe SNX5-Expression auf. Durch Makropinozytose nehmen Makrophagen u.a. ihre Umgebung war. Da für HCMV Makrophagen wichtige Wirtszellen darstellen, war es von Interesse die Wirkung von ppUL35 und ppUL35A auf die Makropinozytose-Aktivität von Makrophagen zu untersuchen. Mittels M-CSF wurden Monozyten aus humanem Blut zu Makrophagen differenziert und mit rekombinanten Adenoviren, die UL35 bzw. UL35A exprimierten, infiziert. Als Nachweis für eine positive Infektion exprimierten die Adenoviren zusätzlich zu dem jeweiligen viralen Protein GFP. Als Kontrolle wurden rekombinante Adenoviren verwendet, die kein UL35 oder UL35A exprimierten. Die infizierten Makrophagen wurden mit Alexa647, als Indikator für Makropinozytose, inkubiert, anschließend fixiert und die Aufnahme von Alexa647 mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 6.5).

Adenoviral-transduzierte Makrophagen, welche bei 37 °C inkubiert wurden, wiesen im Gegensatz zu den 4 °C-Kontrollen eine hohe Aufnahme von Alexa647 auf. Die Inkubation bei 4 °C diente als Kontrolle für eine vollständige Inhibition aller zellulären Transportprozesse und damit auch der Makropinozytose. Adenoviral transduzierte Makrophagen, die bei 4 °C inkubiert wurden, zeigten eine sehr geringe Aufnahme von Alexa647, die vermutlich auf ein Anhaften des Fluorophors auf der Zelloberfläche zurückzuführen ist. Die Expression von UL35 bzw. UL35A hat folglich keinen Einfluss auf die Makropinozytose in Makrophagen.

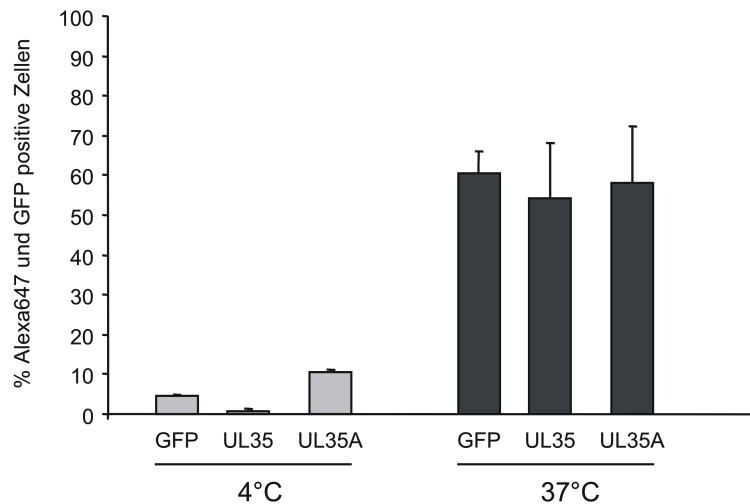


Abbildung 6.5 – Analyse der Makropinozytoseaktivität von adenoviral transduzierten Makrophagen. Von Monozyten differenzierte Makrophagen wurden mit adenoviralen Vektoren für ppUL35 (UL35), ppUL35A (UL35A) und Kontrollvektoren (GFP) infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Flüssigphasen-Indikator Alexa647 inkubiert und die Aufnahme mittels Durchflusszytometer analysiert. Die Inkubation bei 4 °C diente als Negativkontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Die Werte ergeben sich aus dem Mittelwert dreier Ansätze. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

6.5 Die Lokalisation des Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphatrezeptors wird durch ppUL35 und ppUL35A modifiziert

Sorting Nexin 5 bildet als Teil des Retromer-Komplex einen wichtigen Bestandteil des retrograden Transportweges vom Endosom zum TGN. Eine Depletion von endogenem SNX5 durch *small interfering* RNA (siRNA) führte dazu, dass der Kationen-unabhängige Mannose-6-Phosphatrezeptor (CI-M6PR) statt im TGN in frühen Endosomen lokalisiert war (Wasmer et al., 2007; Hara et al., 2008). Um einen Einfluss von ppUL35 und ppUL35A auf die Lokalisation von CI-M6PR zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3-UL35-eYFP bzw. pcDNA3-UL35A-eYFP transfiziert. Als Kontrolle dienten HeLa-Zellen, die mit dem Plasmid pcDNA3 transfiziert wurden. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4% PFA/PBS fixiert und mit einem Antikörper gegen CI-M6PR angefärbt. Die Zellen des Kontroll-experiments zeigten eine konzentrierte punktförmige Ansammlung von CI-M6PR in der Nähe des Zellkerns. Im Gegenteil dazu zeigten Zellen, die ppUL35-GFP bzw. ppUL35A-GFP exprimierten, eine Umverteilung

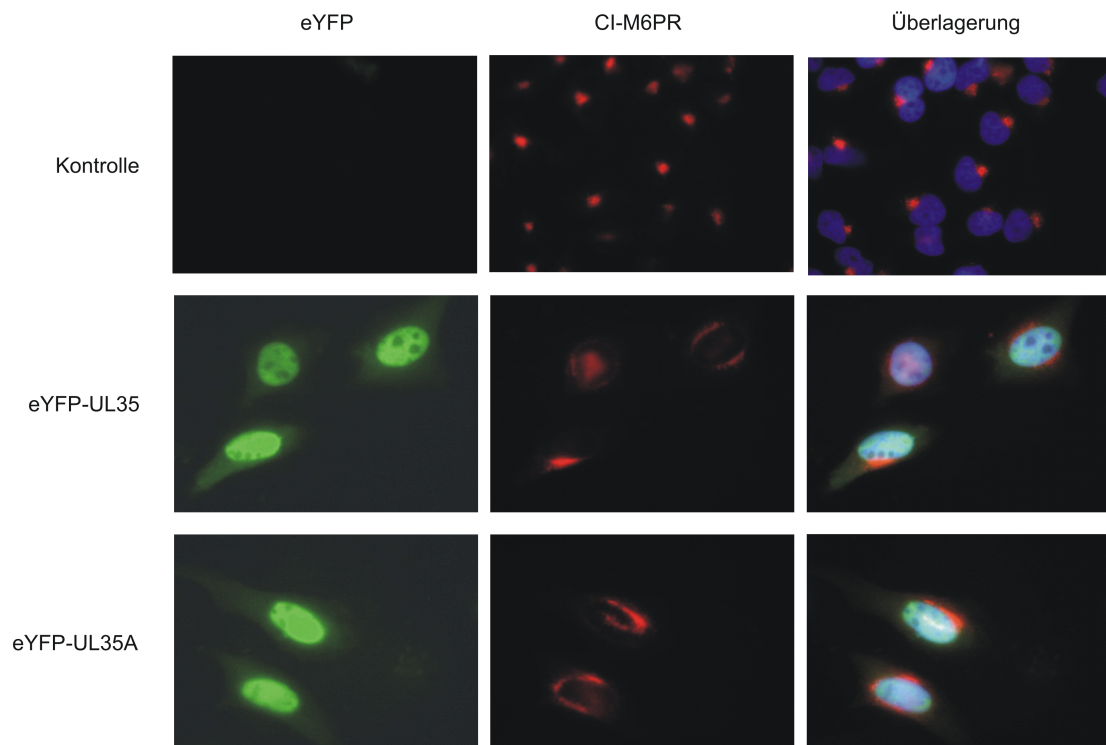


Abbildung 6.6 – Wirkung von ppUL35 und ppUL35A auf die Lokalisation von CI-M6PR. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für eYFP-ppUL35 und eYFP-ppUL35A bzw. Leervektor (Kontrolle) transfiziert. Ein Tag nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen CI-M6PR gefärbt.

von CI-M6PR. Statt einer punktuellen Ansammlung war CI-M6PR amorph um den Zellkern verteilt (Abb. 6.6). Dies belegt, dass beide Formen von UL35 die intrazelluläre Verteilung von CI-M6PR verändern und der Prozess des retrograden Transports nachhaltig beeinflusst wird.

6.6 Die Insertion von fünf Aminosäuren im c-terminalen Bereich von ppUL35 führt zur Störung der Interaktion von ppUL35 und Sorting Nexin 5

Für die Kartierung der Interaktionsdomäne von UL35 mit den zellulären Proteinen wurde mit der *Pentapeptid-Scanning*-Methode Sammlung zufälliger Mutanten hergestellt. Dabei integrierte ein Transposon *in vitro* an zufälliger Position in das Plasmid pcDNA3-

UL35. Das für die Selektion der Transposon-Insertionen verwendete Chloramphenicol-Resistenzgen *CamR* wurde anschliessend durch Restriktionsenzym-Verdau entfernt und die Plasmide religiert. Aufgrund der Lage der Restriktionsschnittstellen in den Transposonenden blieben 15 Nukleotide zurück. Diese Nukleotide kodieren für fünf zusätzliche Aminosäuren, die an Proteinoberflächen Erkennungssequenzen oder Bindestellen stören sollen. Insgesamt wurden 128 UL35-Mutanten erstellt. Die Position der Insertionen wurde mittels Restriktionsenzym-Verdau und DNA-Sequenzierung festgestellt. Von den ursprünglich isolierten Mutanten wiesen 41 ein Stoppcodon auf und wurden nicht weiter verwendet. Insgesamt 86 Mutanten (Tabelle 6.2) wiesen eine Insertion von 5 zusätzlichen Aminosäuren auf; 22 dieser Mutanten lagen gleichmäßig verteilt im Leseraster von UL35A. Bei der praktischen Durchführung wurden das *GPS-Linker Scanning Kit* (New England Biolabs) und für eine zweite Runde das *Mutation Generation System Kit* (Finnzymes) verwendet, da es keine Stoppcodons erzeugt.

Tabelle 6.2 – UL35-Transposonmutanten

laborinterne Nummer	Nukleotidposition	Aminosäuresequenz	Kit
3201	13	CLNTN	NEB
3202	55	VFKHR	NEB
3203	91	AAACG	Finnzymes
3204	113	RPHLL	Finnzymes
3205	137	CMFKH	NEB
3206	143	CLNTN	NEB
3207	150	AAAVG	Finnzymes
3208	180	AAAPV	Finnzymes
3209	186	CLNNA	NEB
3210	235	NAAAV	Finnzymes
3211	260	LFKHT	NEB
3212	280	AAALT	Finnzymes
3213	288	CGRNR	Finnzymes
3214	295	CLNNS	NEB
3215	304	VCLNS	NEB
3216	353	MRPQL	Finnzymes
3217	359	RCGRT	Finnzymes
3218	429	AAASV	Finnzymes
3219	445	DVAAA	Finnzymes

laborinterne Nummer	Nukleotidposition	Aminosäuresequenz	Kit
3220	457	GCGRI	Finnzymes
3221	509	GAAAC	Finnzymes
3222	513	RVFKQ	NEB
3223	528	RVFKQ	NEB
3224	563	NCLNI	NEB
3225	595	VCLNS	NEB
3226	608	DLLFK	NEB
3227	613	LFKHL	NEB
3228	622	CGRTQ	Finnzymes
3229	6329	QLRPQ	Finnzymes
3231	668	LTAAA	Finnzymes
3232	702	EVFKQ	NEB
3233	707	DACGR	Finnzymes
3234	729	LLFKQ	NEB
3235	775	QCGRI	Finnzymes
3236	798	VCLNS	NEB
3237	806	LFKQR	NEB
3238	809	NCLNS	NEB
3239	900	RLRPQ	Finnzymes
3240	903	QLFKQ	NEB
3241	949	HAARI	Finnzymes
3242	991	PGAAA	Finnzymes
3243	1020	MFKQL	NEB
3244	1028	MFKQL	NEB
3245	1038	AAAPT	Finnzymes
3246	1095	CGGRK	Finnzymes
3247	1099	TAAAA	Finnzymes
3248	1112	RMFKQ	NEB
3249	1116	AAARE	Finnzymes
3250	1124	FKHQL	NEB
3251	1139	DPCLN	NEB
3252	1144	CLNNP	NEB
3253	1175	SKCLN	NEB
3254	1208	RVGPH	Finnzymes

laborinterne Nummer	Nukleotidposition	Aminosäuresequenz	Kit
3255	1214	PDAAA	Finnzymes
3256	1237	RAAAL	Finnzymes
3257	1249	FVAAA	Finnzymes
3258	1269	LLRPH	Finnzymes
3259	1308	TECLN	NEB
3260	1314	AAATE	Finnzymes
3261	1328	LFKHL	NEB
3262	1342	MIAAA	Finnzymes
3264*	1351	EGAAA	Finnzymes
3265*	1417	LGAAA	Finnzymes
3266*	1422	AAACG	Finnzymes
3267*	1441	ITAAA	Finnzymes
3268*	1450	HRCLN	NEB
3269*	1466	VCLNS	NEB
3270*	1512	ALRPH	Finnzymes
3271*	1529	SSCGR	Finnzymes
3272*	1543	NAAAP	Finnzymes
3273*	1559	SSCGR	Finnzymes
3274*	1598	ASCLN	NEB
3275*	1601	STCGR	Finnzymes
3276*	1611	AAAAP	Finnzymes
3277*	1630	AAASS	Finnzymes
3278*	1635	AAATT	Finnzymes
3279*	1654	SFAAA	Finnzymes
3280*	1662	GLRPQ	Finnzymes
3281*	1674	AAAHG	Finnzymes
3282*	1724	FKHMV	NEB
3283*	1731	AAASV	Finnzymes
3284*	1739	CGRTL	Finnzymes
3285*	1805	ACGRT	Finnzymes
3286*	1825	CGRTH	Finnzymes

* = Insertion im UL35A-Leserahmen

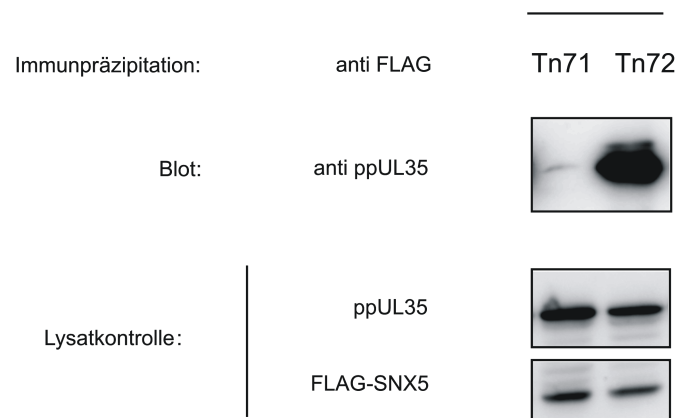


Abbildung 6.7 – Kopräzipitation von SNX5 mit Transposonmutanten von ppUL35. Aus Lysaten von transfizierten HEK 293T-Zellen wurde mit mAb M2 (anti-FLAG) SNX5 präzipitiert und die Kopräzipitation der jeweiligen UL35-Transposonmutante mittels Immunblot und Immunfärbung mit Antiserum gegen ppUL35 nachgewiesen.

Durch die Koimmunpräzipitation von ppUL35A mit FLAG-SNX5 war bekannt, dass SNX5 mit dem C-terminalen Ende von ppUL35 interagiert. Deswegen wurden nur die Transposon-Mutanten mit Insertionen im C-terminalen Teil bzw. im Leseraster von UL35A für die Analyse der Interaktion mit SNX5 herangezogen. Von 87 Mutanten hatten 23 die Transposon-Insertion innerhalb des Bereichs von UL35A. HEK 293T-Zellen wurden mit pCAGGS-FLAG-SNX5 und Expressionsplasmiden für je eine UL35-Mutante transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen geerntet, lysiert und SNX5 mit Protein-G-Sepharose und monoklonalen Antikörpern gegen das FLAG-Peptid präzipitiert. Das Eluat wurde mittels Immunblot auf Kopräzipitation der ppUL35-Mutanten untersucht. Einzig die ppUL35-Mutante Nr. 3271 wurde nicht kopräzipitiert (Abb. 6.7). Diese UL35 Mutante hat an Position 1529 des UL35-Leserasters eine Insertion von 15 Nukleotiden, welche für die Aminosäuren SSCGR kodieren. Im Folgenden wird diese Mutante UL35Tn71 genannt.

6.7 Die transaktivierende Funktion von ppUL35Tn71 ist unabhängig von der Transposoninsertion

Bevor die Mutante UL35Tn71 für die funktionelle Analyse der UL35-SNX5 Interaktion eingesetzt wurde, sollte sichergestellt werden, dass die Insertion der fünf zusätzlichen Aminosäuren keinen generellen Aktivitätsverlust von ppUL35Tn71 hervorruft. Hierzu

wurden zwei Kontrollexperimente, durchgeführt. Zum einen wurde die bereits bekannte Interaktion von ppUL35 mit ppUL82(pp71) (Schierling et al., 2004) durch Koimmunpräzipitation überprüft. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit den Expressionsplasmiden pcDNA3-UL35Tn71 und pcDNA3-UL82 kotransfiziert, und die Lysate für eine Immunpräzipitation von ppUL82(pp71) mit dem monoklonalen Antikörper CMV355 bzw. dem nicht spezifischen Kontrollantikörper 9E10 verwendet. Sowohl ppUL35 als auch ppUL35Tn71 wurden mit ppUL82(pp71) kopräzipitiert (Abb. 6.8), wohingegen die Präzipitation mit Kontrollantikörpern keine Präzipitation von ppUL35 oder ppUL35Tn71 ergab. Dies bestätigt, dass die fünf zusätzlichen Aminosäuren keinen Einfluss auf die Interaktion von ppUL82(pp71) und ppUL35Tn71 haben.

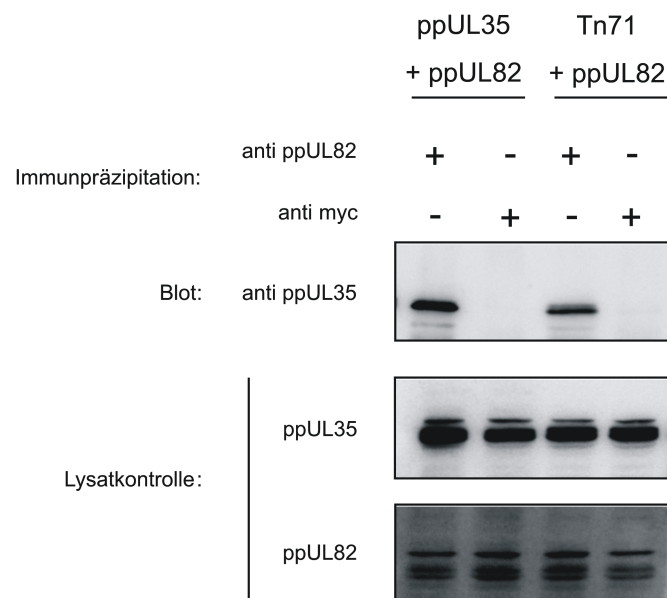


Abbildung 6.8 – Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion von UL35Tn71 mit ppUL82(pp71). Aus Lysaten von transfizierten HEK293T-Zellen wurde mit mab CMV355 (anti-ppUL82(pp71)) ppUL82(pp71) präzipitiert und die Kopräzipitation jeweiligen ppUL35 bzw. ppUL35Tn71 mittels Immunblot und Immunfärbung mit Antiserum gegen ppUL35 nachgewiesen.

Als zweites Kontrollexperiment für die Aktivität von ppUL35Tn71 wurde die Aktivierung des HCMV MIEP durch ppUL35Tn71 untersucht. Zellen der Glioblastom-Zelllinie U373MG wurden mit dem Reporterkonstrukt pHM287 und pcDNA3-UL35, pcDNA3-

UL35Tn71 bzw. pcDNA3 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität mittels Luminometer bestimmt. Die Messung der Luciferaseaktivität ergab eine 2,3-fache Erhöhung der Luciferaseaktivität von Zellen, die mit pcDNA3-UL35 transfiziert wurden, im Vergleich zu Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert wurden. Das Lysat aus Zellen, die mit pcDNA3-UL35Tn71 transfiziert wurden, wies eine 1,9-fache Erhöhung der Luciferaseaktivität verglichen mit dem Leervektor auf (Abb. 6.9). Die Kontrollexperimente konnten zeigen, dass weder die Interaktion mit ppUL82(pp71) noch die transaktivierende Wirkung auf den HCMV MIEP durch die Insertion der zusätzlichen Aminosäuren beeinflusst wird. Dies belegt, dass für ppUL35Tn71, abgesehen von der Interaktion mit SNX5, kein Funktionsverlust vorliegt.

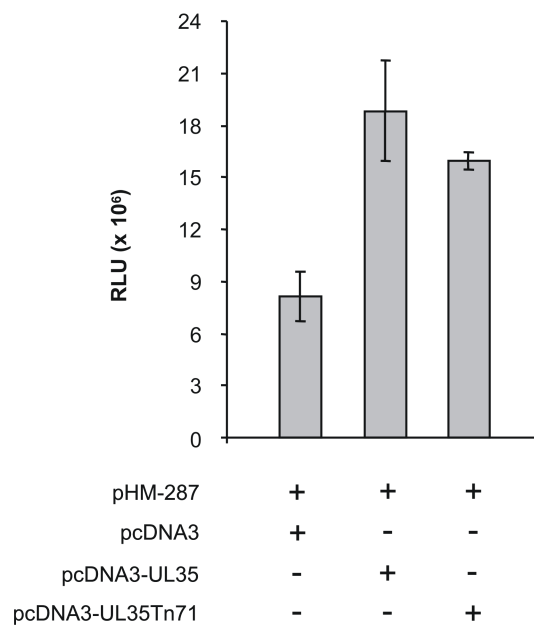


Abbildung 6.9 – Aktivierung des HCMV-MIEP durch ppUL35Tn71. U373 MG-Zellen wurden mit Plasmiden für UL35, UL35Tn71 und dem Leervektor (pcDNA3) transfiziert. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte in einem Luminometer und ist hier als RLU (*relative light units*) dargestellt.

Für die Untersuchung der zellulären Lokalisation von ppUL35Tn71 wurden HeLa-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3-UL35 bzw. pcDNA3-UL35Tn71 transfiziert. Die Präparate wurden mit anti-ppUL35 Antiserum und entsprechendem Sekundärantikörper gefärbt. Es zeigte sich, dass die Lokalisation von ppUL35Tn71 im Vergleich zum Wildtyp

ppUL35 unverändert ist. Beide Proteine sind kernlokalisiert mit leichter cytoplasmatischer Lokalisation (Abb. 6.10).

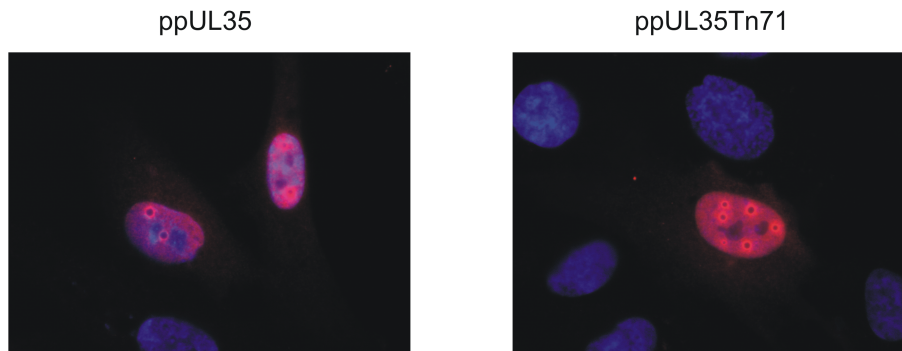


Abbildung 6.10 – Zelluläre Lokalisation von ppUL35Tn71. HeLa-Zellen wurden mit den Plasmiden für ppUL35 und ppUL35Tn71 transfiziert und mit einem Kaninchen-Antiserum gegen ppUL35 gefärbt (rot). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau).

6.8 Die intrazelluläre Lokalisation von CI-M6PR ist unbeeinträchtigt durch ppUL35Tn71

Sorting Nexin 5 ist als Teil des Retromerkomplexes an der Erkennung und am retrograden Transport von CI-M6PR beteiligt. Da die Expression von UL35 und UL35A eine Umverteilung von CI-M6PR bewirkt, sollte die Auswirkung der SNX5-bindungsdefizienten UL35Tn71 Mutante auf die zelluläre Verteilung von CI-M6PR untersucht werden. HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden für ppUL35Tn71 transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit fixiert. Nach Permeabilisierung und Blockierung der unspezifischen Bindestellen wurden die Zellen mit Kaninchen Antiserum gegen ppUL35 und mit monoklonalen Maus Antikörpern gegen CI-M6PR gefärbt. Sowohl Zellen, die mit UL35Tn71 transfiziert wurden, als auch nicht-transfizierte Kontrollzellen zeigten eine punktuelle kernnahe Lokalisation von CI-M6PR. Die Expression von UL35Tn71, das nicht mehr mit SNX5 interagieren kann, hat also keine Auswirkung auf die zelluläre Verteilung des Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphatrezeptors. Dies steht im Kontrast zu ppUL35 und ppUL35A, die einen deutlichen Einfluss auf die Verteilung von CI-M6PR in der Zelle haben (Abb. 6.11). Darüber hinaus bestätigt dieses Experiment,

dass die Interaktion von ppUL35 und ppUL35A mit SNX5 ursächlich für die zelluläre Umverteilung von CI-M6PR ist.

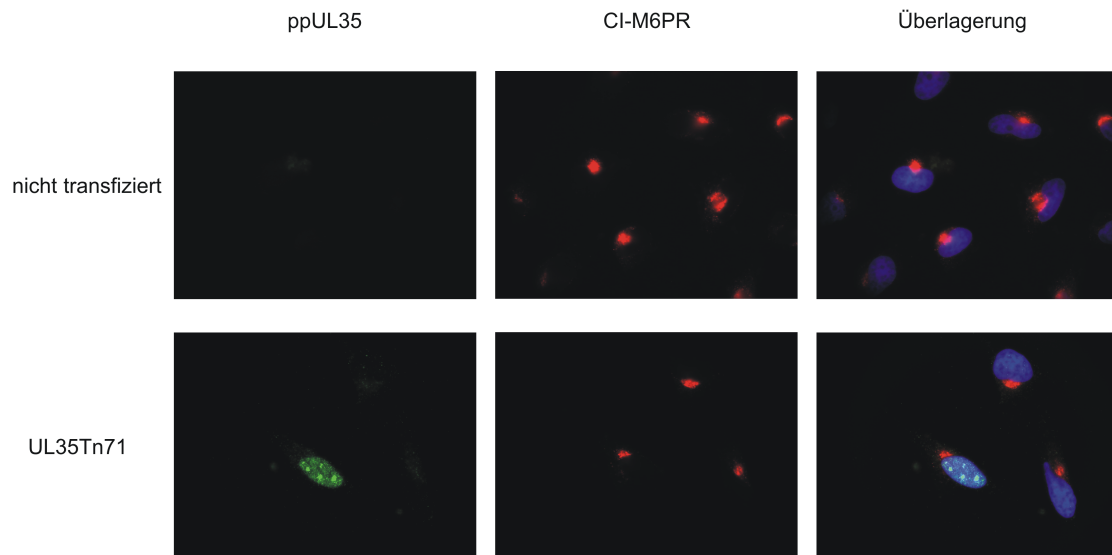


Abbildung 6.11 – Zelluläre Lokalisation von CI-M6PR in Anwesenheit von ppUL35Tn71. HeLa-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3-UL35Tn71 transfiziert und mit einem Antiserum gegen ppUL35 (grün) und monoklonalen Antikörpern gegen CI-M6PR (rot) gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau).

6.9 Die Mutation von UL35 im viralen Genom führt zu Replikationsdefekten

Um zu untersuchen, ob die fehlende Interaktion von ppUL35 bzw. ppUL35A einen Einfluss auf die HCMV-Replikation hat, sollten Virusmutanten generiert werden, die jeweils nur eine Form von UL35 bzw. kein UL35 exprimieren. Darüber hinaus sollte eine Möglichkeit geschaffen werden die Transposonmutanten aus dem Expressionsplasmid in ein HCMV-BAC zu überführen, um die Wirkung von UL35Tn71 zu untersuchen. Zur Herstellung von HCMV-Stämmen mit mutiertem UL35-Gen wurde das BAC-Konstrukt TB40E-BAC4 (Sinzger et al., 2009) verwendet. Das TB40E-BAC4 beruht auf dem klinischen Isolat TB40E, welches im Gegensatz zu Viren des Stamms AD169 eine Vielzahl von Zelltypen infiziert. Die Einführung von Mutationen in das UL35-Gen wurde unter Verwendung des *Red*-Rekombinasesystems durchgeführt. Dadurch konnten Veränderungen im BAC

vorgenommen werden, ohne dass zusätzliche Nukleotide oder Schnittstellen über die gewollten Mutationen hinaus zurückbleiben. Die Expression der langen Form von UL35 wurde durch Mutation des Startcodons ATG in ein Codon für Alanin inhibiert. Das resultierende BAC trägt den Namen TB40EdUL35. Die Revertante TB40dEUL35rev wurde durch Mutation des Alanin-Codons zurück in ein Startcodon hergestellt. Zur Deletion des gesamten UL35-Leserahmens wurde der Leserahmen gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette (*KanR*) ausgetauscht. Dieses BAC wurde TB40delUL35 benannt. Bei der Herstellung blieben die ersten und letzten 50 Nukleotide des UL35 Leserasters bestehen; sie dienten in den folgenden Schritten als homologe Sequenzen um UL35-Sequenzen aus Expressionsplasmiden durch homologe Rekombination einzufügen. Um eine Mutante herzustellen, die nur die lange Form von UL35 exprimiert, wurde das UL35-Gen des Plasmids pcDNA3-UL35Ad3ATG verwendet. In diesem Plasmid wurden die putativen Startcodons von UL35A in Alanin-Codons mutiert (Karina Schierling, unveröffentlicht). Die mutierte Expressionskassette wurde mittels Restriktionsendonuklease ausgeschnitten und mittels homologer Rekombination gegen die Kanamycin-Resistenzkassette im BAC TB40EdUL35 ausgetauscht. Das resultierende BAC wurde TB40EdUL35A benannt. Auf die gleiche Weise wurden die Transposonmutante TB40EUL35Tn71 und die Revertante TB40ERev zur Wiederherstellung der Expression von UL35 und UL35A in das BAC eingeführt (Abb. 6.12).

Zur Überprüfung der Integrität des BACs wurde BAC-DNA isoliert und mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* inkubiert. Die Fragmente wurden auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und zeigten keine Veränderung im Fragmentmuster im Vergleich zum Wildtyp-BAC (Abb. 6.13). Einzig TB40EdUL35 wies aufgrund des Austausches von UL35 gegen die Kanamycin-Resistenzkassette eine Veränderung des Fragmentmusters auf, was jedoch durch Einsetzen der Expressionskassette von UL35 wiederhergestellt werden konnte. Die Integrität der erzeugten BACs blieb also erhalten. Um infektiöse Viren aus den mutierten BACs zu generieren, wurde die BAC-DNA isoliert und in HFF-Zellen transfiziert. Nach ca. zwei Wochen konnten die ersten Plaques mit infizierten Zellen erkannt werden. Die Rekonstitution der UL35-Mutanten dauert im Vergleich zur Rekonstitution des TB40E-BAC4 (3 Wochen) wesentlich länger (9 Wochen). Obwohl die Replikationskinetik für die Mutante RvdUL35 sich nur gering vom Wildtypvirus unterscheidet, dauerte die Rekonstitution dieser Mutante auch 8 Wochen. Anfängliche Plaques blieben sehr klein und breiteten sich nur sehr langsam aus. Die rekonstituierten Viren wurden Rv (rekombinantes Virus) RvdelUL35, RvdUL35, RvdUL35A, RvdelUL35rev, RvdUL35rev und RvUL35Tn71 genannt. Somit konnten mehrere Virusmutanten im UL35-Gen hergestellt und rekonstituiert werden.

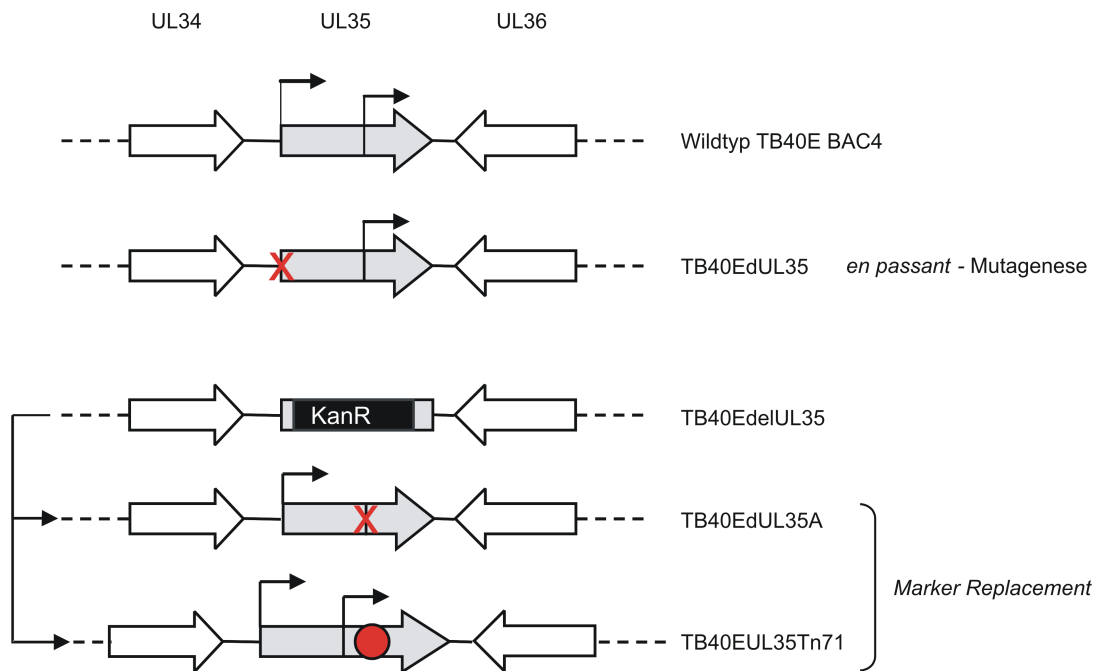


Abbildung 6.12 – Schematische Darstellung der eingeführten Mutation im Leserahmens von UL35. Im BAC TB40E-BAC4 wurde mittels *en passant* Mutagenese das erste Startcodon im Leserahmen von UL35 in ein Alanin-Codon mutiert (TB40EdUL35). Für die Deletion von UL35 wurde der UL35-Leserahmen mittels *en passant* Mutagenese durch die Expressionskassette des Kanamycinresistenz-Gens *KanR* ersetzt (TB40EdelUL35). Durch *Marker Replacement* wurde *kanR* gegen einen UL35-Leserahmen ersetzt, dessen Startcodons für UL35A in Alanin-Codons mutiert wurden (TB40EdUL35A). Ebenfalls durch *Marker Replacement* wurde *kanR* gegen einen UL35Tn71-Leserahmen ersetzt (TB40EUL35Tn71).

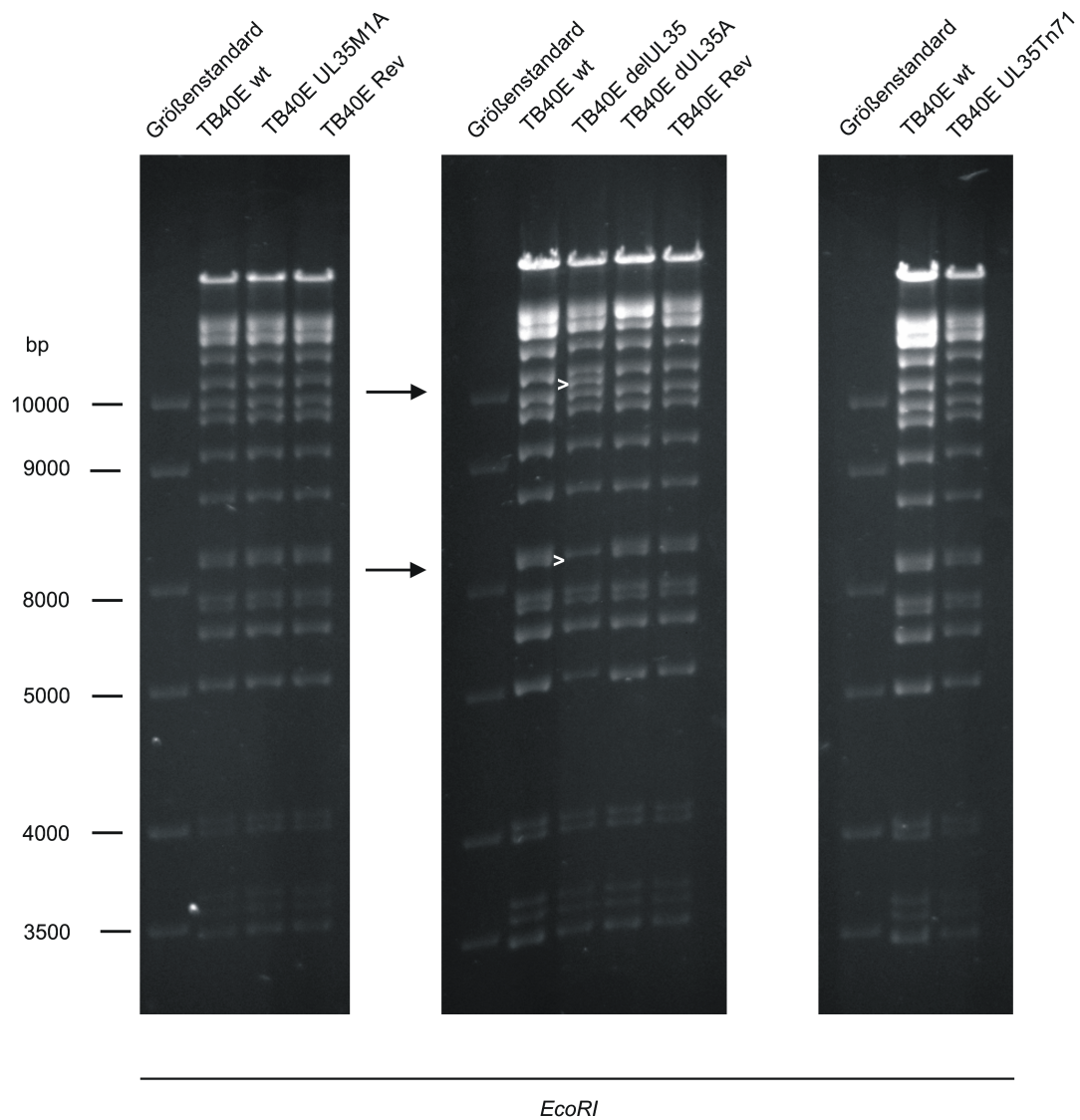


Abbildung 6.13 – Restriktionsfragment-Analyse der mutierten BACs. Zur Überprüfung der BAC-Integrität wurden BAC-DNAs aus Bakterienkulturen isoliert. Die BAC-DNA wurde mit *EcoRI* verdaut und auf einem 0,8%-Agarosegel bei 40 V aufgetrennt. Pfeile weisen auf die Veränderungen des Fragmentmusters von TB40EdelUL35 hin.

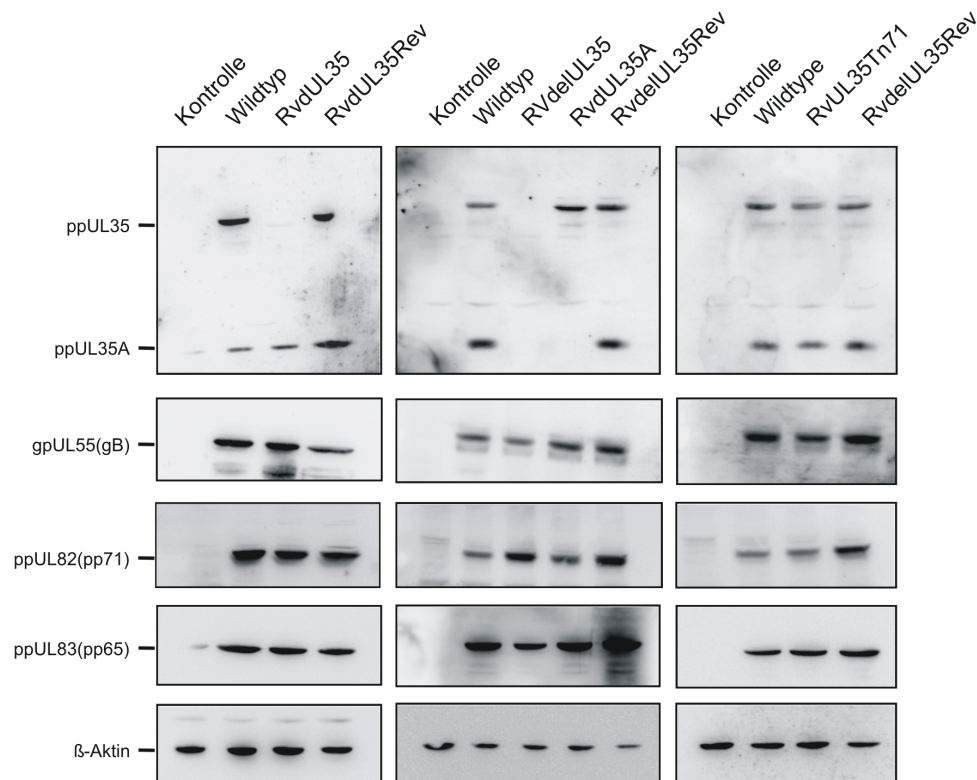


Abbildung 6.14 – Expression viraler Proteine in infizierten Fibroblasten. Zur Untersuchung der Expression von ppUL35 und ppUL35A wurden humanen Fibroblasten mit UL35-Mutanten und Wildtyp-Virus infiziert und 96 Stunden nach der Infektion lysiert. Die Immunblots wurden mit Antiseren gegen die Tegumentproteine ppUL35 und ppUL82(pp71) und monoklonale Antikörpern gegen das Glykoprotein gpUL55(gB), das Tegumentprotein ppUL83(pp65) und β -Aktin gefärbt.

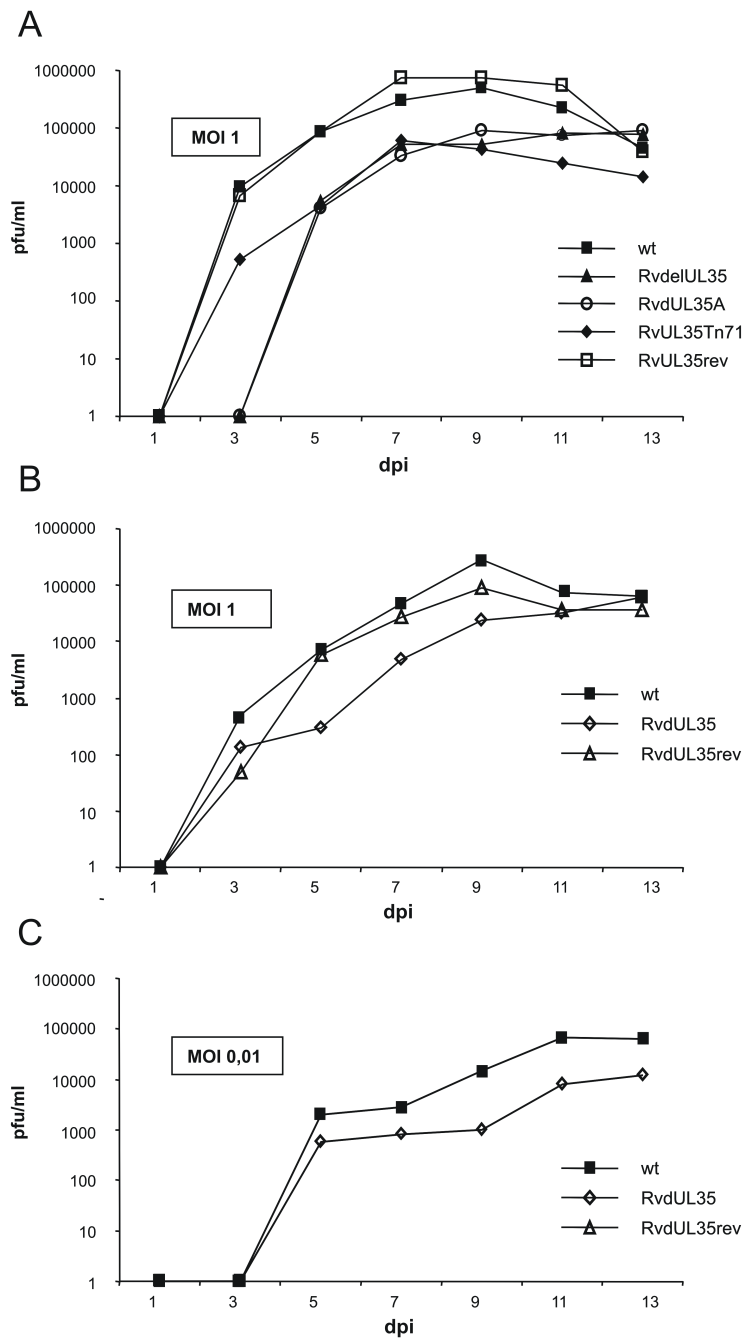


Abbildung 6.15 – Virusreplikationskinetiken der UL35-Mutanten. HFF wurden mit dem HCMV-Wildtypvirus und den UL35-Mutanten infiziert und der Zellkulturüberstand wurde an den jeweiligen Tagen abgenommen und der Titer bestimmt.

Zunächst sollte die Translation von ppUL35 und ppUL35A und der Mutante ppUL35Tn71 in infizierten Zellen überprüft werden. Humane Fibroblasten wurden mit den UL35-Mutanten infiziert (MOI 1) und die Zellen 96 Stunden nach Infektion abgelöst, lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Immunfärbung mit UL35-Antiserum zeigte für den Wildtypvirus die Expression von ppUL35 und ppUL35A, die aber in RvdelUL35 infizierten Zellen fehlte (Abb. 6.14). Zellen, die mit RvdUL35 infiziert wurden, zeigten keine Translation der langen Form, ppUL35, jedoch konnte die kurze Form, ppUL35A, nachgewiesen werden. Umgekehrt konnte in mit RvdUL35A infizierten Zellen ppUL35, jedoch nicht ppUL35A nachgewiesen werden. Sowohl die Revertante für RvdUL35 (RvdUL35rev) als auch die Revertante für RvdelUL35 (RvdelUL35rev) wiesen die Translation von beiden Formen auf. Auch mit RvUL35Tn71 infizierte Zellen exprimierten beide Formen von UL35. Neben den UL35-Proteinen wurde die Expression weiterer wichtiger Strukturproteine überprüft. Die Tegumentproteine ppUL83(pp65) und pUL82(pp71) sowie das Glykoprotein gpUL55(gB) wurden bei allen Viren unverändert translatiert. Die als Ladekontrolle durchgeführte Immunfärbung für β -Aktin zeigte eine gleichmäßige Beladung der Gele. Somit zeigten alle Mutanten das angestrebte Expressionsmuster für die UL35-Proteine. Die Translation ausgewählter Strukturproteine zeigte in allen Viren keine signifikanten Änderungen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die jeweiligen UL35-Virusmutanten in ihrem Replikationsverlauf vom Wildtyp-Virus unterscheiden. Hierzu wurden Replikationskinetiken mit unterschiedlichen MOI untersucht. Humane Fibroblasten wurden mit MOI 1 infiziert und die Zellkulturüberstände an festgelegten Zeitpunkten nach der Infektion geerntet und titriert. Bei Infektionen mit MOI 1 zeigten RvdelUL35 und RvdUL35A im Vergleich zum Wildtyp einen um einen Tag verzögerten Replikationsverlauf und einen zehnfach verringerten Virustiter. Die Revertante RvUL35rev zeigte wieder einen mit dem Wildtyp vergleichbaren Replikationsverlauf. Im Unterschied zu den anderen UL35-Mutanten zeigte der zeitliche Verlauf der Replikation von RvUL35Tn71 verglichen mit dem Wildtyp keinen verzögerten Replikationsverlauf. Jedoch wies RvUL35Tn71 über den zeitlichen Verlauf einen ca. zehnfach verringerten Titer auf (Abb. 6.15A). Der Replikationsverlauf der dUL35-Mutante zeigte bei einer MOI 1 nur eine geringe Abweichung von der Replikationskinetik des Wildtyps und der Revertante RvdUL35rev (Abb. 6.15B). Dagegen wurden bei einer MOI 0,01 im Replikationsverlauf von RvdUL35 im Vergleich zum Wildtyp-Virus etwa zehnfach niedrigere Virustiter festgestellt (Abb. 6.15C). Die Deletion des gesamten UL35-Leserahmens bzw. die ausbleibende Translation von UL35A hat somit einen negativen Effekt auf die Replikation von HCMV. Wohingegen die fehlende Translation von ppUL35 nur einen schwachen inhibierenden Effekt auf die Replikationskinetik von

HCMV hat. Die Mutante UL35Tn71 zeigte einen intermediären Replikationsverlauf, der keine Effekte im frühen Abschnitt aufweist, jedoch eine starke Hemmung im späten Stadium erkennen lässt. Weiterhin konnte anhand der Mutante UL35Tn71 der Einfluss der Interaktion von ppUL35 mit SNX5 auf die HCMV-Replikation nachgewiesen werden.

6.10 Die Mutation von UL35 ist verantwortlich für eine Umverteilung von HCMV-Tegumentproteinen und Glykoproteinen

In einer früheren Publikation wurde beschrieben, dass die Deletion des UL35-Gens im HCMV-Genom eine veränderte Lokalisation von viralen Proteinen während der späten Phase der Infektion bewirkt (Schierling et al., 2004). Um den Einfluss von UL35 auf die Lokalisation viraler Proteine in der späten Phase zu untersuchen, wurden Fibroblasten mit dem Wildtyp-Virus und den UL35-Mutanten infiziert und 96 Stunden nach der Infektion die Lokalisation von ppUL83(pp65), ppUL82(pp71), ppUL32(pp150) und gpUL55(gB) mit monoklonalen Antikörpern detektiert (Abb. 6.10). In der späten Phase der Infektion werden die Tegumentproteine ppUL83(pp65) und ppUL82(pp71) vom Zellkern in das Cytoplasma exportiert. In den Zellen, die mit dem Wildtyp-Virus infiziert wurden, lagen die Proteine im Cytoplasma vor. Diese Verteilung wurde auch in Zellen, die mit RvUL35Tn71 infiziert waren, festgestellt. In den Fibroblasten, die mit den UL35-Mutanten RvdelUL35 bzw. RvdUL35A infiziert wurden, waren beide Proteine größtenteils im Zellkern lokalisiert. Dies deckt sich mit Beobachtungen an Virusmutanten des Laborstammes AD169 (Schierling, 2004). Auch ppUL82(pp71) wird in der späten Phase aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert. In Zellen, die mit RvdelUL35 oder RvdUL35A infiziert waren, konnte ppUL82(pp71) größtenteils im Zellkern nachgewiesen werden. Fibroblasten, die mit RvUL35Tn71 infiziert waren, wiesen wie der Wildtyp ppUL82(pp71) im Cytoplasma auf. Das Glykoprotein gpUL55(gB) ist in der späten Phase der Infektion in der Nähe des Kerns in einer kompakten und kreisförmigen Struktur, dem viralen *Assembly Center*, lokalisiert. Zellen, die mit den UL35-Mutanten RvdelUL35, RvdUL35, RvdUL35A oder RvUL35Tn71 infiziert wurden, wiesen dagegen eine veränderte, stark diffuse Verteilung von gpUL55(gB) im Cytoplasma auf. Diese diffuse Verteilung in mit RvUL35Tn71 infizierten Zellen zeigt, dass die Interaktion mit SNX5 für Lokalisation von gpUL55(gB) wichtig ist. Das Tegumentprotein ppUL32(pp150) ist in der späten Phase vorrangig kernnah im *Assembly Center* lokalisiert.

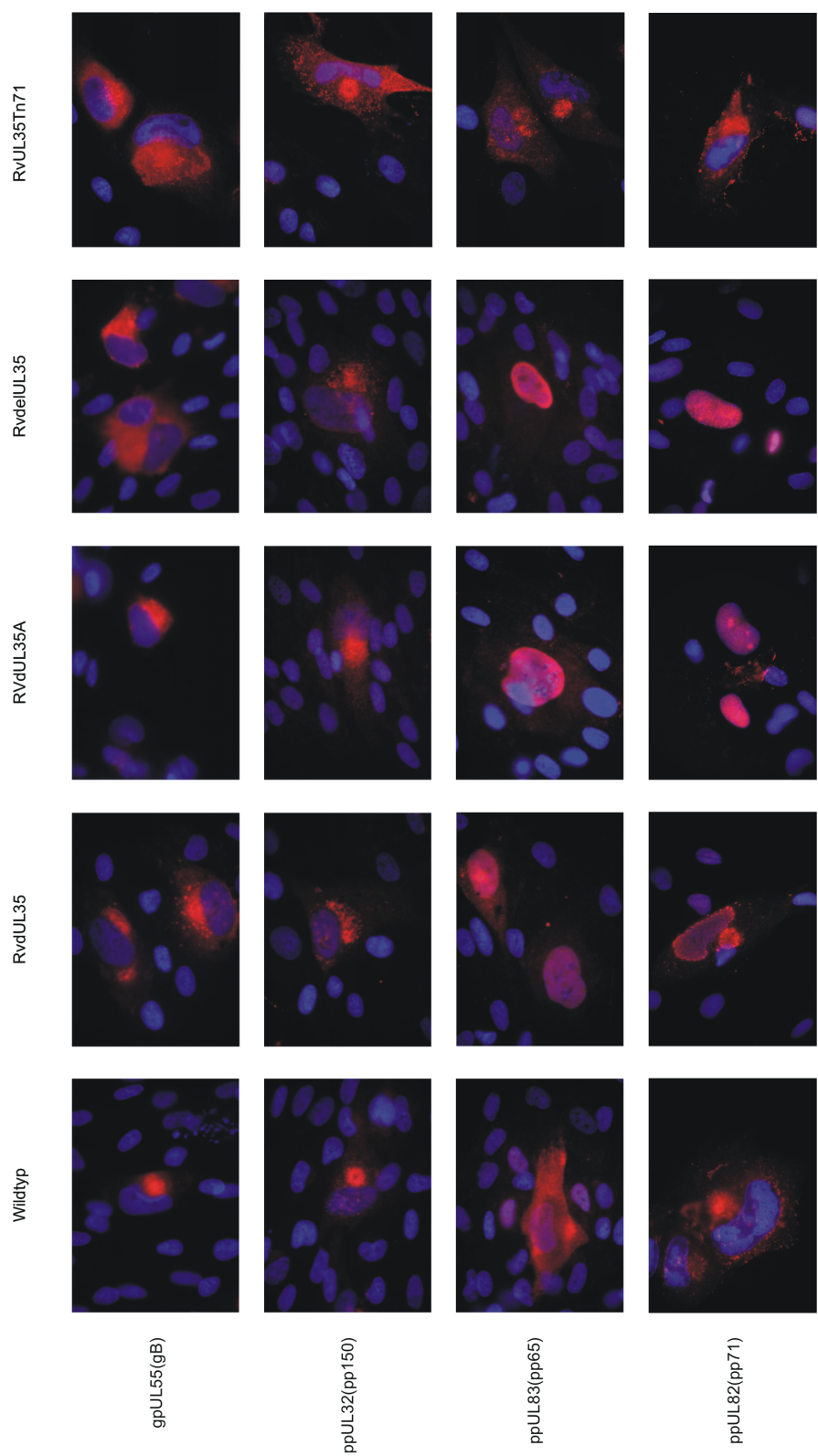


Abbildung 6.16 – Lokalisation von viralen Proteinen in der späten Phase der Infektion. Humane Fibroblasten wurden mit TB40E Wildtyp und den UL35-Mutanten infiziert und 96 Stunden nach der Infektion mit Paraformaldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen ppUL82(pp71), ppUL83(pp65), ppUL32(pp150), gpUL55(gB) gefärbt (rot). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau).

In den Virusmutanten RvdelUL35, RvdUL35 und RvdUL35A war ppUL32(pp150) diffus lokalisiert während bei RvUL35Tn71 die ringförmige Struktur des *Assembly Centers* deutlich erkennbar blieb. Die Deletion des ganzen UL35-Gens aus dem HCMV-Genom oder bereits die inhibierte Expression einer der beiden UL35 Formen führt zu einer Umverteilung von viralen Strukturproteinen während der späten Phase der Infektion. Bei der RvUL35Tn71-Mutante tritt diese Umverteilung aber nur für gpUL55(gB) auf. Dies spricht dafür, dass die Regulation von SNX5 bedeutsam für das Zusammensetzen des Viruspartikels ist und die fehlende Regulation von SNX5 durch ppUL35 oder ppUL35A eine Umverteilung von gpUL55(gB) zur Folge hat.

6.11 Die Modulation der Expression von Sorting Nexin 5 beeinflusst die Virusreplikation

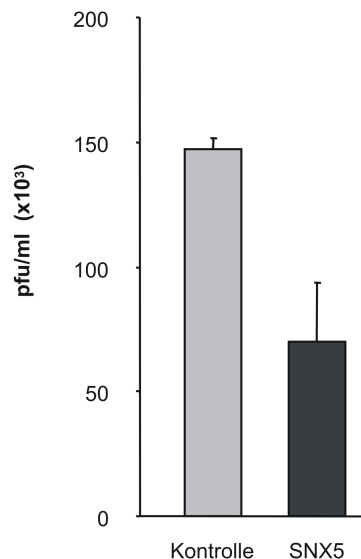


Abbildung 6.17 – Virusreplikation bei Überexpression von SNX5. Humane Fibroblasten wurden mit Expressionsplasmiden für SNX5 oder Leervektor (Kontrolle) transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit Wildtyp-HCMV infiziert. Sieben Tage nach der Infektion wurde der Virustiter bestimmt. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment.

Zur Untersuchung der Bedeutung der Interaktion von Sorting Nexin5 mit ppUL35 für die Virusreplikation wurde SNX5 in infizierten Fibroblasten überexprimiert. Ein Tag vor der Infektion wurden Fibroblasten mit pCAGGS-FLAG-SNX5 bzw. Leervektor

transfiziert und am darauf folgenden Tag mit dem Wildtyp-Virus infiziert (Abb. 6.17). Die Zellkulturüberstände wurden nach sieben Tagen geerntet und titriert. Der Virustiter von Zellen, die FLAG-SNX5 exprimierten, war um 50% verringert im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem Leervektor transfiziert wurden. Da die Überexpression von Sorting Nexin 5 in infizierten Zellen zu einer Reduktion des Virustiters führte, war es interessant, die Auswirkung der Depletion von Sorting Nexin 5 in infizierten Fibroblasten zu untersuchen. Humane Fibroblasten wurden 24 Stunden vor der Infektion mit siRNA gegen SNX5 bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert und am folgenden Tag mit dem Wildtyp-Virus, RvdelUL35, RvdUL35, RvdUL35A und RvUL35Tn71 mit der MOI 1 infiziert. Die Zellkulturüberstände wurden nach sieben Tagen geerntet und titriert (Abb. 6.18B).

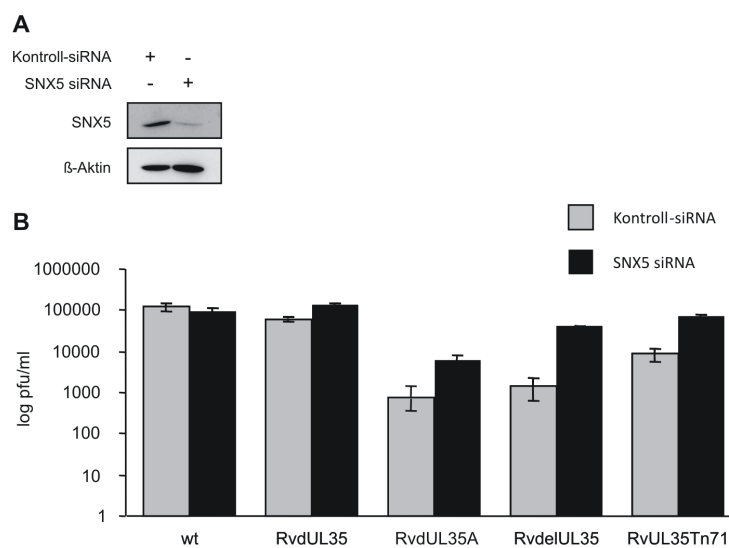


Abbildung 6.18 – Wirkung der Depletion von endogenem SNX5 auf die Replikation von HCMV mit mutiertem UL35-Leserahmen. (A) Depletion von SNX5 durch eine siRNA gegen SNX5. (B) Humane Fibroblasten wurden mit siRNA gegen SNX5 und Kontroll-siRNA transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit Wildtyp-Virus infiziert. Sieben Tage nach der Infektion wurde der Virustiter bestimmt. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Experimenten.

Auf den Titer des Wildtyp-Virus hatte die Depletion von SNX5 keinen signifikanten Einfluss, wie zu erwarten, wenn die Funktion von UL35 die negative Regulation von SNX5 ist. Der Virustiter von RvdUL35 zeigte im Vergleich mit dem Wildtyp nur geringe Abweichungen. Entsprechend führte die Depletion von SNX5 führte bei RvdUL35 nur zu einer minimalen Erhöhung des Virustiters, während sich bei den anderen UL35-Mutanten der Virustiter nach Depletion von SNX5 zwischen ein und zwei Zehnerpotenzen erhöht.

Der Virustiter von RvUL35Tn71 erreichte nach Depletion von SNX5 wieder die Höhe des Wildtyp-Titers. Für RvdelUL35 und RvdUL35A konnte allerdings der Titer des Wildtyps nicht vollständig wiederhergestellt werden, was auf zusätzliche Defekte hinweist. Zusammenfassend konnte die Deletion bzw. Mutation der UL35-Proteine zumindest partiell durch die Depletion von SNX5 kompensiert werden.

6.12 Die Depletion von Sorting Nexin 5 stellt nach Infektion mit UL35-Mutanten die korrekte Lokalisation von gpUL55(gB) wieder her

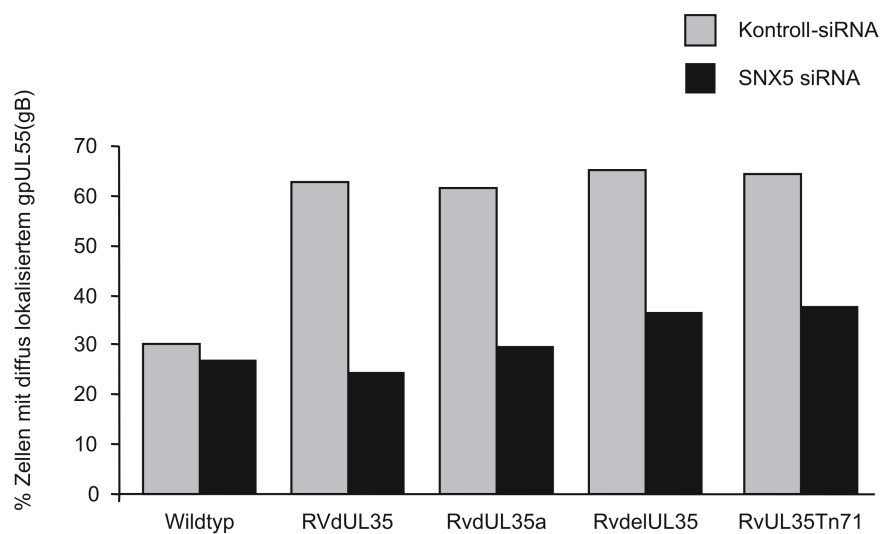


Abbildung 6.19 – Wirkung der Depletion von endogenem SNX5 auf die Replikation von HCMV mit mutiertem UL35-Leserahmen. Humane Fibroblasten wurden mit siRNA gegen SNX5 und Kontroll-siRNA transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit Wildtyp-Virus infiziert. Sieben Tage nach der Infektion wurde der Virustiter bestimmt. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Experimenten

Das Glykoprotein gpUL55(gB) ist in der späten Phase der Infektion im *Assembly Center* mit endosomalen Vesikeln und Vesikeln des TGN kolokalisiert. Da die Depletion von SNX5 mittels siRNA in transient transfizierten HeLa-Zellen zu Veränderungen im intrazellulären Transport und Aufbau des TGN führte, sollte auch die Auswirkung der Depletion von SNX5 in infizierten Zellen untersucht werden. Hierfür wurden Humane Fibroblasten mit einer siRNA gegen SNX5 bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit Wildtyp-Virus, RvdelUL35, RvdUL35,

RvdUL35A und RvUL35Tn71 mit einer MOI von 0,5 infiziert und nach 96 Stunden mit Paraformaldehyd fixiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen mit dem monoklonalen anti gpUL55(gB)-Antikörper 27-278 gefärbt. Mikroskopisch wurden jeweils mindestens 100 Zellen analysiert und die Verteilung von gpUL55(gB) als „diffus“ oder „kompakt“ klassifiziert (Abb. 6.19). In Zellen, welche mit Wildtyp Virus infiziert wurden, unterschied sich die Lokalisation von gpUL55(gB) kaum zwischen Zellen, die mit Kontroll-siRNA oder SNX5-siRNA transfiziert waren. Ungefähr 25% der Zellen wies eine diffuse Lokalisation von gpUL55(gB) auf. In Kontroll-siRNA transfizierten Zellen, die mit UL35-Virusmutanten infiziert wurden, stieg der Anteil der Zellen mit diffuser Verteilung von gpUL55(gB) auf annähernd 60%. Die Depletion von SNX5 konnte den Anteil der Zellen mit diffuser Lokalisation wieder auf ca. 25% verringern. Die Depletion von SNX5 konnte somit die diffuse Verteilung des Glykoproteins gpUL55(gB) in Fibroblasten, die mit den UL35-Mutanten infiziert wurden, fast vollständig umkehren.

6.13 Die Lokalisation der Glykoproteine gpUL75(gH), gpUL100(gM) und gpUL73(gN) ist unabhängig von UL35

Da HCMV neben gpUL55(gB) für weitere Glykoproteine kodiert, die während der späten Phase in die Virushülle integriert werden, sollte der Einfluss von SNX5 auf die Lokalisation anderer viraler Glykoproteine untersucht werden. Dazu wurden humane Fibroblasten auf Deckgläschen ausgesät und mit dem Wildtypvirus und den UL35-Mutanten infiziert. 96 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit monoklonalen Antikörpern gegen die Glykoproteine gpUL55(gB), gpUL75(gH), gpUL100(gM) und gpUL73(gN) gefärbt (Abb. 6.13). Im Gegensatz zur Verteilung von gpUL55(gB), die bei den UL35-Mutanten teils stark diffus und abweichend von der Lokalisation beim Wildtyp-Virus ist, zeigt sich keine Veränderung der Lokalisation von gpUL75(gH), gpUL100(gM) oder gpUL73(gN) bei den UL35-Mutanten. Die fehlende Translation von ppUL35 bzw. ppUL35A hat offenbar keinen Effekt auf die zelluläre Lokalisation von gpUL75(gH), gpUL100(gM) oder gpUL73(gN). Die Interaktion von ppUL35 oder ppUL35A mit SNX5 wirkt sich nach diesen Erkenntnissen spezifisch nur auf die Lokalisation von gpUL55(gB) aus.

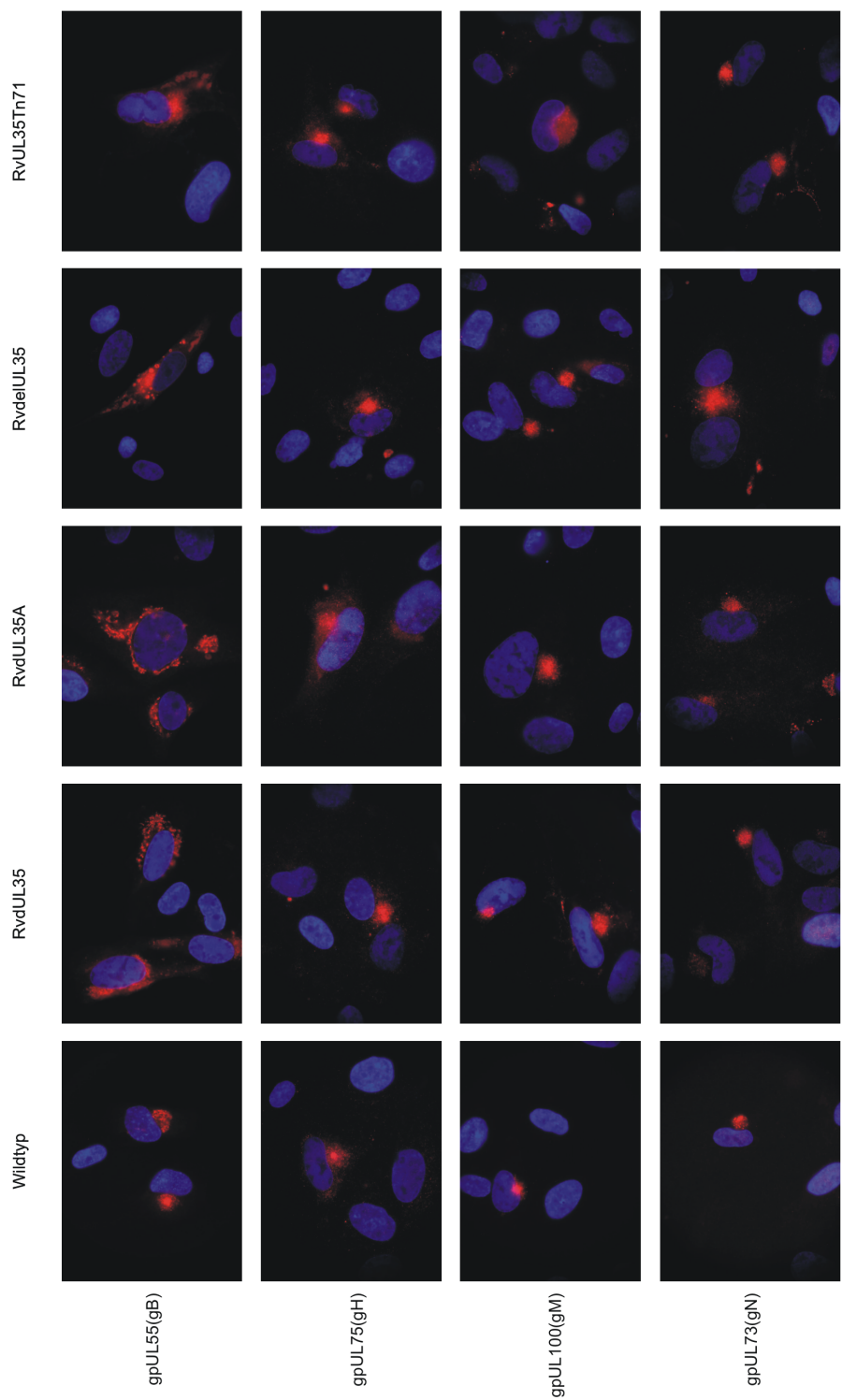


Abbildung 6.20 – Lokalisation von viralen Glykoproteinen in der späten Phase der Infektion. HFF wurden mit TB40E-wt und den UL35-Mutanten infiziert und 96 Stunden nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und mit monoklonalen Antikörpern gegen gpUL55(gB), gpUL75(gH), gpUL100(gM) und gpUL73(gN) gefärbt (rot). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau).

7 Diskussion

Das HCMV-Gen UL35 kodiert für zwei Proteine, ppUL35 und die kurze Form ppUL35A. Ab der frühen Phase wird ppUL35A translatiert, wohingegen ppUL35 erst in der späten Phase translatiert und in das Viruspartikel als Tegumentprotein verpackt wird (Liu und Biegalka, 2002). Die Deletion des UL35 Gens in rekombinantem HCMV ergab, dass die Viren die initiale Phase in MOI-abhängiger Weise modulieren und starke Replikationsdefekte in der späten Phase verbunden mit Störungen bei der Lokalisation von viralen Proteinen und des Zusammenbaus neuer Viruspartikel aufweisen (Schierling et al., 2005). Bislang wurden vor allem die, regulatorischen Effekte in der initialen Phasen untersucht, in deren Verlauf ppUL35 eine transaktivierende und ppUL35A eine reprimierende Wirkung auf den HCMV MIEP haben (Schierling et al., 2004). In transienten Zellkulturversuchen konnte nachgewiesen werden, dass ppUL35 zelluläre Proteine in *nuclear bodies* rekrutiert (Salsman et al., 2011) und durch Interaktion mit Komponenten der DNA-Reparatur-Antwort eine Inhibition des Zellzyklus auslöst (Salsman et al. 2012). Eine Erklärung für die Defekte in der späten Phase und während der Reifung von Viruspartikeln konnte noch nicht gefunden werden.

7.1 Die Protein-Interaktion von ppUL35 und ppUL35A mit Sorting Nexin 5 beeinflusst intrazelluläre Transportprozesse

In einem *Yeast Two-Hybrid Screen* konnte neben anderen zellulären Proteinen Sorting Nexin 5 als Bindungspartner von ppUL35 identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Protein-Protein-Interaktion mittels Koimmunpräzipitation aus transient transfizierten Zellen bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die lange Form ppUL35 als auch die kurze Form ppUL35A mit SNX5 interagieren. Dies belegt, dass ppUL35 mit dem C-terminalen Ende mit SNX5 interagiert. Zur Eingrenzung der Bindestelle in SNX5 wurden Koimmunpräzipitationen von ppUL35 und verkürzten Varianten von SNX5 durchgeführt. Hier wurde festgestellt, dass ppUL35 an die BAR-Domäne von SNX5 bindet. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Arbeiten überein, die zeigten, dass zelluläre Proteine vorrangig mit der BAR-Domäne von SNX5 interagieren (Towler et al., 2004, Yoo et al., 2006; Hara et al., 2008). Als Teil des Retromerkomplexes ist SNX5 an der Erkennung und Sortierung von Proteinen für den retrograden Transport von

frühen Endosomen zum TGN beteiligt. Weiterhin konnte für SNX5 eine Funktion in der Makropinozytose nachgewiesen werden (Lim et al., 2008). Makropinozytose ist eine Form der unspezifischen Aufnahme von Flüssigkeit aus dem umgebenden Medium. Viele Zelltypen nehmen umgebendes Medium über Makropinozytose auf. Vor allem Makrophagen, wichtige Zielzellen der HCMV-Infektion, sind makropinozytostisch aktiv und registrieren durch Makropinozytose ihre Umgebung. Darüber hinaus spielt die Makropinozytose bei der Aufnahme von HCMV in einigen Zelltypen (z.B. Endothelzellen oder Makrophagen) eine entscheidende Rolle (Haspot et al., 2012; Vanarsdall und Johnson, 2012). Daher sollte der Einfluss von ppUL35 und ppUL35A auf die SNX5-regulierte Makropinozytose zunächst in HeLa-Zellen untersucht werden. Die transiente Expression von Sorting Nexin 5 mit UL35 oder UL35A zeigte, dass sowohl ppUL35 als auch ppUL35A die SNX5-regulierte Makropinozytose in HeLa-Zellen inhibieren. Um diese Erkenntnisse auf Zellen zu erweitern, die suszeptibel für HCMV sind und eine Rolle in der Infektion spielen, wurden humane Makrophagen aus Blutspenden verwendet. Jüngste Veröffentlichungen (Lim et al., 2012) berichten von einer erheblichen Rolle des Sorting Nexins 5 in der Makropinozytose in Makrophagen. Mittels adenoviraler Transduktion wurde in den Makrophagen ppUL35 bzw. ppUL35A exprimiert und die Makropinozytoseaktivität gemessen. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen UL35 und UL35A transduzierten Zellen und Kontrollzellen. Was darauf schließen lässt, dass unter den verwendeten experimentellen Bedingungen weder ppUL35 noch ppUL35A einen Effekt auf die Makropinozytose in Makrophagen haben. Ein kritischer Punkt bei der Arbeit mit Makrophagen sind verschiedene Methoden zur Isolation von Makrophagen und unterschiedlich gewonnene Makrophagenpopulationen. Dies erschwert es die hier gewonnen Befunde mit denen anderer Arbeitsgruppen zu vergleichen. Daher kann die Rolle von SNX5 in HCMV-Infektionen von Makrophagen nicht abschließend beurteilt werden.

Als Bestandteil des Retromer-Proteinkomplexes spielt SNX5 auch eine Rolle im retrograden Transport, bei dem Membranproteine von der Plasmamembran endozytotisch aufgenommen werden und von frühen Endosomen zum TGN transportiert werden. Der Retromerkomplex ist dabei für die Erkennung und Anreicherung von Membranproteinen in bestimmten Regionen der frühen Endosomen verantwortlich (McGough und Cullen, 2011). Die Interaktion von Sorting Nexinen mit gekrümmten Membranen führt zur Rekrutierung weiterer Adapterproteine und der Abschnürung dieser tubulären Bereiche in Vesikel. Diese Vesikel werden weiter zum TGN transportiert. Bei der Erforschung des Retromer-Komplexes wurde der Kationen-unabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (CI-M6PR) als Zielprotein identifiziert (Wassmer et al., 2007). CI-M6PR zirkuliert zwi-

schen frühen Endosomen und TGN und steuert den Proteintransport vom Golgi-Apparat zu späten Endosomen und Lysosomen (Braulke und Bonifacino, 2009). Die Depletion von SNX5 hat eine Störung des Transport von CI-M6PR von Endosomen zum TGN zur Folge, was in einer diffusen Verteilung zum Ausdruck kommt (Wassmer et al., 2007; Hara et al., 2008). Die transiente Expression von UL35 bzw. UL35A ergab eine Umverteilung von CI-M6PR von einer kernnahen, kompakten zu einer unregelmäßigen, verstreuten Verteilung. Dieses Muster ähnelt der Verteilung von CI-M6PR in SNX5-depletierten Zellen (Hara et al., 2008). In diesen Versuchen mit siRNA gegen SNX5 konnte gezeigt werden, dass CI-M6PR in frühen Endosomen lokalisiert ist (Hara et al., 2008). Allerdings konnte die genaue Lokalisation von CI-M6PR bei Anwesenheit von ppUL35 oder ppUL35A noch nicht bestimmt werden. Jedoch zeigte sich, dass ppUL35 und ppUL35A einen Effekt auf die Funktion von SNX5 im intrazellulären Sortierungsprozess haben und den retrograden Transport von CI-M6PR stören können.

Für die Kartierung der Bindestelle von SNX5 an ppUL35 und ppUL35A wurde eine *Pentapeptid-Scanning*-Mutagenese (Hayes und Hallet, 2000) durchgeführt, bei der mittels *in vitro* Transposon-Mutagenese zufällig 15 Nukleotide in die Expressionskassette des Plasmid pcDNA3-UL35 eingefügt wurden. Die daraus resultierenden fünf zusätzlichen Aminosäuren können je nach Insertionsstelle eine Erkennungssequenz stören oder die Faltung von Interaktionsdomänen verändern (Haapa et al., 1999; Baker et al., 1993). Nach der Durchführung der Mutagenese konnten 85 UL35-Mutanten isoliert werden. Von diesen Mutanten wiesen 24 Mutanten eine Insertion innerhalb des UL35A-Leserrasters auf. Da von vorangegangenen Experimenten bekannt war, dass SNX5 im C-terminalen Bereich von ppUL35 bindet, wurden für die Kartierung der Bindestellen von SNX5 nur diese 24 Mutanten weiter analysiert. Lediglich für eine (UL35Tn71) der 24 untersuchten UL35-Mutanten konnte keine Interaktion mit SNX5 nachgewiesen werden. Eine anschließende Analyse bereits bekannter biologischer Funktionen von ppUL35 bzw. ppUL35A, wie die Interaktion mit ppUL82(pp71) oder die Aktivierung des HCMV-Promotors ergab keine Beeinträchtigung von ppUL35Tn71 auf diesem Gebiet. Auch waren keine Unterschiede in der Kernlokalisierung von ppUL35Tn71 erkennbar. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Insertion der zusätzlichen Aminosäuren nur die Interaktion mit SNX5 unterbunden wird und keine generellen strukturellen Veränderungen innerhalb von ppUL35 für den beobachteten Funktionsverlust verantwortlich sind.

7.2 Die Regulation von Sorting Nexin 5 durch ppUL35 und ppUL35A ist wesentlich für die Virusreplikation

Um die bis hier gemachten Erkenntnisse über die Protein-Protein-Wechselwirkung von ppUL35 und SNX5 auf ihre Rolle während einer HCMV-Infektion zu übertragen, wurden rekombinante HCMV-Stämme hergestellt, bei denen die Translation von ppUL35 bzw. ppUL35A, die Translation beider Isoformen ppUL35 und ppUL35A durch die Mutation der entsprechenden Startcodons ausgeschaltet wurde. Weiterhin wurde ein Virusstamm für die Translation der SNX5-bindungsdefizienten Mutante ppUL35Tn71 hergestellt. Für die Ausschaltung der Translation von ppUL35 (dUL35) wurde im endotheliotropen BAC TB40E mittels *en passant* Mutagenese das erste Startcodon von UL35 mutiert. Um die Translation von ppUL35A auszuschalten, wurde zunächst der UL35-Leserahmen gegen die *KanR*-Expressionskassette (Kanamycinresistenz) ausgetauscht. Auf beiden Seiten der *KanR*-Kassette verblieben 50 Nukleotide des UL35-Leserahmens. In diesem BAC wurde anschließend die *KanR*-Kassette gegen ein UL35-Gen mit mutierten Startcodons für UL35A (dUL35A) ausgetauscht. Diese neue Strategie wurde erstmalig in dieser Arbeit angewendet und bietet den Vorteil, dass verschiedene Varianten des zu erforschenden Gens mit nur einem Selektionsschritt in das BAC eingesetzt werden konnten, wie das UL35Tn71-Gen. Die Varianten wurden durch Restriktion aus Plasmiden gewonnen, so dass eine komplette Amplifikation des UL35-Leserahmens mit nachfolgender kompletter Sequenzierung nicht notwendig war. Aus allen BACs konnten infektiöse Viren rekonstituiert werden. Die Expression von ppUL35 und ppUL35A wurde mittels Immunblots von infizierten HFF nachgewiesen und zeigte in allen Fällen das erwartete Muster. Die Immunblots zeigten auch, dass die Expression anderer viraler Proteine durch die veränderte Expression von UL35 nicht beeinflusst wird.

Die Analyse der Replikationskinetiken der UL35-Mutanten in humanen Fibroblasten bei einer MOI 1 zeigte, dass die Viren bei denen die Expression von ppUL35A (RV-dUL35A) bzw. ppUL35A und ppUL35 (RVdelUL35) inhibiert wurde, einen verzögerten Replikationsverlauf und eine ca. zehnfach verringerte Replikationsrate haben. Die Replikationskinetiken entsprechen den veröffentlichten Replikationskinetiken des Laborstammes AD169 mit einer Deletion des gesamten UL35-Gens (Schierling et al., 2005). Jedoch zeigten sich bei dieser Mutante die Unterschiede in der Replikationskinetik bei einer niedrigen MOI (0,1 und 0,01), während sie bei den hier erstellten und beschriebenen Mutanten bereits bei einer MOI von 1 auftraten. Diese Abweichung liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Herkunft der beiden Virusstämme begründet. Während HCMV TB40E aus einer klinischen Probe isoliert wurde und nur kurz in Zellkultur passagiert

wurde (Sinzger et al., 2009), wurde AD169 nach der Isolation wiederholt in Fibroblasten passagiert. Dies führte zu Veränderungen im viralen Genom (Cha et al., 1996), eine Einschränkung der suszeptiblen Zellen auf Fibroblasten und eine Anpassung an die Replikation in Fibroblasten. Die Virusmutanten ohne ppUL35-Expression (RVdUL35) zeigten bei der MOI 1 nur geringe Unterschiede im Vergleich zum Wildtypvirus. Bei einer MOI von 0,1 zeigte sich die Replikation von RVdUL35 jedoch deutlich abgeschwächt. Scheinbar ist die virale Replikation stärker abhängig von ppUL35A als von ppUL35. Die Viren mit der Insertion von fünf Aminosäuren in der Bindestelle von SNX5 in ppUL35 zeigten eine verringerte Replikationsrate, jedoch keinen verzögerten Anstieg der Replikation. Der Verlauf der Replikationskinetik lässt dabei auf einen Defekt in der späten Phase der Virusinfektion schließen.

Bei der weiteren Charakterisierung der UL35-Virusmutanten wurde die Lokalisation der viralen Strukturproteine ppUL83(pp65), ppUL82(pp71), ppUL32(pp150) und gB(gpUL55) in infizierten Fibroblasten untersucht. Die mit UL35-Mutanten infizierten Zellen wiesen eine nukleäre Lokalisation der Tegumentproteine ppUL83(pp65) und ppUL82(pp71) auf. Beide Proteine sind in Wildtyp-infizierten Zellen in der späten Phase im Cytoplasma lokalisiert. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass gpUL55(gB) statt einer kompakten cytoplasmatischen Verteilung eine stark diffuse Verteilung bei den UL35-Mutanten aufweist. Besonders interessant war die diffuse Verteilung von gpUL55(gB), da dieses Glykoprotein während seines Reifungsprozesses entlang des sekretorischen Weges transportiert wird und auf dem Rückweg über den endosomalen Weg in das TGN gelangt. Bei diesem Transport wird es möglicherweise von SNX5 und dem Retromer rekrutiert und reguliert. Die beschriebene Umverteilung von viralen Strukturproteinen konnte auch bei Versuchen mit einer UL35-Deletionsmutante im Laborstamm AD169 (Schierling et al., 2005) beobachtet werden. In dieser Publikation wurde gezeigt, dass durch die Deletion von UL35 die Lokalisation verschiedener viraler Proteine in der späten Phase verändert und auch das Zusammensetzen der Viruspartikel gestört ist. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch die Deletion von ppUL35 oder ppUL35A das Tegumentprotein ppUL32(pp150) im Kern lokalisiert ist statt im Cytoplasma. Da sowohl ppUL82(pp71) als auch ppUL32(pp150) mit ppUL35 interagieren (Schierling, 2004; Phillips und Bresnahan, 2010), lässt sich daraus schließen, dass die fehlende Interaktion mit ppUL35 den Export aus dem Kern ins Cytoplasma beeinträchtigt. Für die Lokalisation von ppUL83(pp65) während der späten Phase der Infektion kann ppUL35 indirekt über eine Interaktion mit Kernimport-Proteinen beteiligt sein.

Interessanterweise zeigte die SNX5-bindungsdefekte UL35-Virusmutante RvUL35Tn71 nur eine diffuse Lokalisation von gpUL55(gB), während die Lokalisation von ppUL82(pp71),

ppUL83(pp65) oder pUL32(pp150) im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert war. Die Lokalisation anderer untersuchter HCMV-Glykoproteine war bei keiner der Virusmutanten beeinträchtigt. Dies lässt darauf schließen, dass die Interaktion von ppUL35 und SNX5 keinen Einfluss auf die Lokalisation dieser Tegumentproteine hat und die unterschiedliche Lokalisation wohl auf einer direkten Interaktion mit ppUL35 zurückzuführen sein könnte. Die veränderte Verteilung von gpUL55(gB) in den von den UL35-Mutanten infizierten Zellen lässt sich auf die fehlende Regulation der Aktivität von SNX5 durch ppUL35 bzw. ppUL35A zurückführen. Daraus lässt sich schließen, dass ppUL35 und ppUL35A die Lokalisation von gpUL55(gB) und damit die Zusammensetzung der *Assembly Centers* und die Zusammensetzung der Viruspartikel beeinflussen. Da diese Störung der Lokalisation von gpUL55(gB) auch bei der SNX5-bindungsdefizienten Mutante UL35Tn71 auftrat.

Das Glykoprotein gpUL55(gB) reift im Endoplasmatischen Reticulum und im sekretorischen Weg, während es zur Zellmembran transportiert wird. Über Endozytose und frühe Endosomen gelangt gpUL55(gB) zurück in das TGN (Radsak et al. 1996; Sanchez et al., 2000; Jarvis et al., 2002). Da SNX5 als Teil des Retromers am retrograden Transport von frühen Endosomen beteiligt ist, stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, welche Rolle SNX5 in der zellulären Lokalisation von gpUL55(gB) und der viralen Replikation spielt. Die siRNA vermittelte Depletion von SNX5 führte in infizierten Zellen mit UL35-Mutanten in der späten Phase zu einer Akkumulation von gpUL55(gB) im *Assembly Center*, während in Kontrollexperimenten gpUL55(gB) weiterhin eine diffuse Lokalisation aufwies. Diese Befunde weisen darauf hin, dass UL35 durch die Regulation von SNX5 einen Einfluss auf die Lokalisation von gpUL55(gB) hat. In Folge von siRNA induzierter Depletion von SNX5 konnte der Replikationsdefekt der UL35-Mutanten teilweise aufgehoben werden. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von SNX5 in Fibroblasten zu einer verringerten Replikation führten. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass SNX5 Einfluss auf die Replikation von HCMV hat. Ob dieser Einfluss allein auf der Lokalisation von gpUL55(gB) beruht oder aber auf der Mislokalisierung verschiedener zellulärer und viraler Proteine bei der Bildung des *Assembly Centers*, bleibt noch zu klären. Fraglich ist auch, in wie weit die Endozytose von gpUL55(gB) essentiell für die Lokalisation im *Assembly Center* und damit auch für den Einbau in die Virushülle ist. Mehrere Publikationen machen geltend, dass die endozytotische Aufnahme von gpUL55(gB) keine Rolle für die Virusreplikation spielt. Zum einen konnte durch die Verwendung von dominant-negativen Dynamin I-Mutanten gezeigt werden, dass die Inhibition der Endozytose keinen Einfluss auf die HCMV-Replikation hat (Jarvis et al., 2002). Weiterhin veränderte die Entfernung des C-Terminus und damit die Entfernung von möglichen Endozytose-Signalsequenzen aus dem Pseudorabiesvirus gB nicht den Einbau

in die Hülle und die Infektiosität (Nixdorf et al., 2000). Auch für Glykoproteine anderer Herpesviren konnte gezeigt werden, dass die Endozytose keine Rolle für den Einbau in die Viruspartikel spielt (Tirabassi, et al., 1999; Brideau et al., 2000; Ortiz de Zarate et al., 2007). Andererseits enthält HCMV gpUL55(gB) neben Di-Leucin-Motiven auch einer Häufung von sauren Aminosäuren (*acidic cluster*) als Erkennungssequenz für PACS-1, einen Regulator für den Transport von Endosomen zum TGN. Bei Depletion von PACS-1 ist gpUL55(gB) in diffus verteilten Vesikeln statt im TGN lokalisiert und es kommt zu einer Verringerung des Virustiters (Crump et al., 2003). Einen weiteren Anhaltspunkt für die Relevanz der Endozytose von herpesviralen Hüllproteinen für die Virusreplikation zeigte die Korrelation von optimaler HCMV-Replikation mit der Endozytose von gpUL132 (Kropff et al., 2010). Wie schon von Kropff et al. erörtert, muss man bei der Diskussion um die Notwendigkeit der Endozytose von viralen Hüllproteinen für die Virusreplikation im Auge behalten, dass die Hemmung bzw. der Ausfall eines Endozytoseweges durch andere Aufnahmewege ausgeglichen werden kann. Zusätzlich kann gpUL55(gB) und andere virale Hüllproteine vom TGN direkt in frühe Endosomen transportiert werden, ohne den Umweg über die Plasmamembran (Crump et al., 2003; DeMatteis und Luini, 2008). Generell scheinen die intrazellulären Transportwege und Sortierungsmechanismen für Herpesviren von großer Bedeutung für die Reifung der Viruspartikel zu sein. Dies wird deutlich durch die Anzahl verschiedener Transportwege und zellulärer Transportproteine, die für die späte Phase der Infektion wichtig sind. Mehrere Veröffentlichungen weisen auf die Bedeutung von regulatorischen Proteinen des sekretorischen Transportweges wie rab27a (Fraile-Ramos et al., 2010) Bicaudal D1 (Indran et al., 2010); rab6 (Indran und Britt, 2011), Syntaxin3 (Cepeda and Fraile-Ramos, 2011), Snapin 23 (Shen et al., 2011) für die HCMV-Replikation hin. Darüber hinaus wurden auch Komponenten des endosomal-retrograden Transportweges wie Dynein (Bukovich et al., 2010) und Teile des ESCRT-Weges (Tandon et al., 2009) als wichtig für die Replikation von HCMV beschrieben. Depletion oder Inhibierung dieser Proteine führte meist zu verringertem Virustiter.

7.3 Sorting Nexine regulieren wichtige Prozesse in der viralen Replikation

Die Bedeutung von Sorting Nexinen im intrazellulären Transport und als wichtiger Faktor für virale Infektionen konnten auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen mit VSV (Vesikuläres Stomatitis Virus) und HPV (Humanes Papillomvirus) zeigen. Die Überexpression von SNX16 führte zu einer signifikant verringerten Infektionsrate von VSV. (Le Blanc et al., 2005). VSV wird durch Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen und fusioniert

nach Ansäuerung des Endosom die virale Hüllmembran mit der endosomalen Membran, infolgedessen gelangt das Nukleokapsid in das Cytosol und die virale Replikation beginnt. Die Messung von freigesetzter viraler RNA aus Endosomen infizierter Zellen legte nahe, dass SNX16 den Nukleokapsid-Export aus dem späten Endosom reguliert. Sorting Nexin 16 gehört zur Untergruppe der Sorting Nexine ohne zusätzliche Proteindomänen neben der PX-Domäne und ist an späten Endosomen vertreten (Brankatschk et al., 2011). Untersuchungen mit HPV-11 und HPV16 zeigten, dass SNX17 mit dem Kapsidprotein L2 interagiert (Marušič et al., 2012). SNX17 besitzt neben der PX-Domäne eine FERM-Domäne (Protein4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) und bindet an die N-P-X-Y-Signalsequenz von Transmembranproteinen in Endosomen und verhindert deren Degradation im Lysosomen (Knauth et al., 2005). Eine siRNA vermittelte Depletion von SNX17 führte zu einer signifikanten Verringerung der Infektionsrate von HPV. Es konnte gezeigt werden, dass SNX17 für die Freisetzung der viralen DNA aus dem Endosomen benötigt wird. Beide Veröffentlichungen unterstreichen die Bedeutung von Sorting Nexinen für virale Infektionen. Während in den beschriebenen Veröffentlichungen die Sorting Nexine in der ersten Phase (Eindringen, Entpacken) wichtig sind, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Sorting Nexine auch in der späten Phase (*assembly*) einer viralen Infektion eine Rolle spielen können.

Für die Aufklärung des molekularen Mechanismus, über den ppUL35, ppUL35A und SNX5 die Virusreifung regulieren, sind weitere umfangreiche Untersuchungen notwendig. Zur Erklärung sind mehrere Modelle (Abb. 7.1) möglich. I) Durch Interaktion mit SNX5 wird die Funktion des gesamten Retromerkomplexes inhibiert. II) Die Inhibition von SNX5 führt nicht zur vollständigen Inhibition des Retromer. Nur bestimmte SNX5-abhängige Transportprozesse sind unterbunden (Exklusion). Es kommt zur Anhäufung bestimmter Proteine im frühen Endosomen. III) Die Funktion von SNX5 wird nicht inhibiert, sondern von ppUL35 bzw. ppUL35A gesteuert, und Proteine werden spezifisch vom frühen Endosomen ins TGN transportiert (Selektion). Es kommt zur Anhäufung bestimmter Proteine im TGN. Die ersten beiden Modelle sind sehr ähnlich und beruhen auf der Inhibition des Retromer bzw. von Komponenten des Retromers. Jedoch ist es aufgrund der Möglichkeit der Kompensation von SNX5 durch andere Sorting Nexine, eher unwahrscheinlich, dass das gesamte Retromer inhibiert wird. Plausibler erscheinen daher die Modelle II und III. Wobei auch für die Exklusion bestimmter Proteine vom Transport ins TGN (Modell II) wieder die Möglichkeit des Ausgleichs durch andere Transportwege bzw. -mechanismen besteht. Allgemein kann die Nutzung bestimmter Transportwege und die Akkumulation viraler Protein in bestimmten Transportwegen oder Transportvesikeln

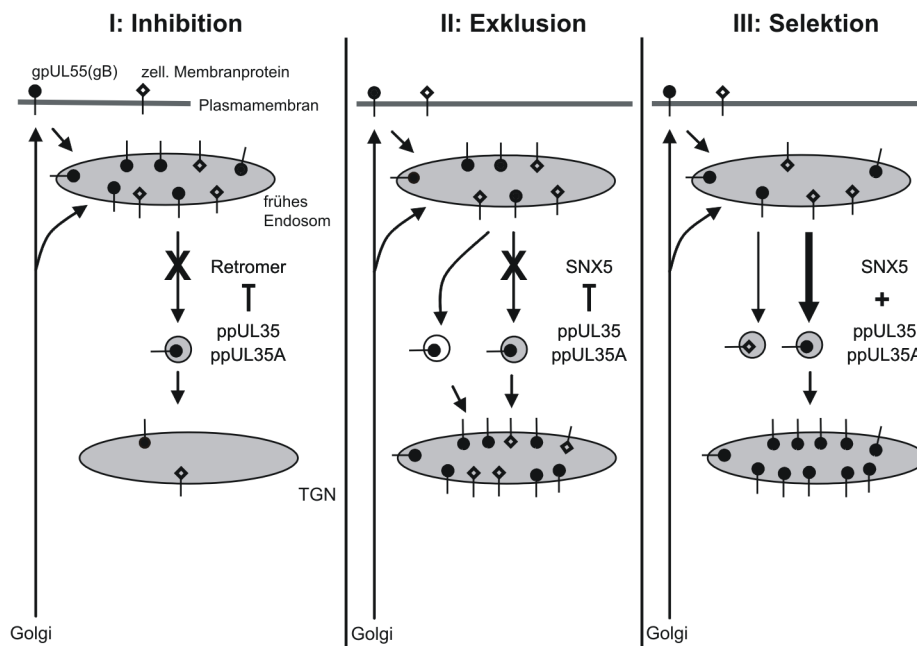


Abbildung 7.1 – Schematische Darstellung möglicher Modelle der SNX5-ppUL35/ppUL35A Interaktion. **Inhibition:** Die viralen Proteine ppUL35 und ppUL35A inhibieren durch Interaktion mit SNX5 den gesamten Retromer-Komplex. Der retrograde Transport vom Endosom zum TGN ist vollständig inhibiert. **Exklusion:** SNX5 wird durch ppUL35 und ppUL35A gehemmt. Bestimmte Proteine werden nicht mehr ins TGN transportiert. Der retrograde Transport kann über einen alternativen Transportweg verlaufen. **Selektion:** Die Substraterkennung des Retromers wird von ppUL35 bzw. ppUL35A reguliert und bestimmte Proteine werden bevorzugt vom frühen Endosom ins TGN transportiert.

durch die drei beschriebenen Modelle für das Zusammensetzen der Viruspartikel von Vorteil sein.

7.4 Ausblick

Eine Untersuchung der Zusammensetzung der Viruspartikel der UL35-Mutanten kann entscheidende Rückschlüsse auf die tatsächliche Wirkung von ppUL35, ppUL35A und SNX5 auf die Reifung der Viruspartikel geben. Weiterhin könnten dadurch weitere Proteine identifiziert werden, deren Rekrutierung von ppUL35 oder ppUL35A beeinflusst werden. Um die Rolle von SNX5, des Retromers und UL35 in der Virionenreifung weiter zu beleuchten, wäre es interessant zu untersuchen, ob weitere Sorting Nexine oder Retromerkomponenten mit ppUL35 oder ppUL35A interagieren. Dazu könnte auch eine mechanistische Untersuchung der Interaktion zwischen SNX5 und ppUL35 bzw. ppUL35A beitragen. Da gpUL55(gB) mehrere Di-Leucin-Motive im cytoplasmatischen Teil enthält und einige Aminosäuresequenzen Ähnlichkeiten mit den beschriebenen Retromer-Erkennungssequenzen aufweisen, wäre es interessant, gpUL55(gB) und andere virale Membranproteine auf eine Interaktion mit dem Retromer zu untersuchen. Zusammengefasst, konnte in der vorliegenden Arbeit die regulierende Wirkung der Proteininteraktion zwischen den viralen Proteinen ppUL35 und ppUL35A und dem zellulären Protein SNX5 auf die Lokalisation des Glykoproteins gpUL55(gB) und die Virusreplikation nachgewiesen werden. Eine Aufklärung der Rolle des Retromer-Komplexes, bzw. des retrograden Transportes im Allgemeinen, während der späten Phase der Virusinfektion könnte wichtige Informationen über die noch immer unverstandene Virionenreifung liefern.

8 Literaturverzeichnis

Almeida S, Ryser S, Obarzanek-Fojt M, Hohl D & Huber M. 2010. The TRAF-interacting protein (TRIP) is a regulator of keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* 131, 349-357.

Anders DG, Kerry JA & Pari GS. 2007. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, *DNA synthesis and late viral gene expression*. Cambridge University Press, 295-310.

Anderson KP, Fox MC, Brown-Driver V, Martin MJ & Azad RF. 1996. Inhibition of Human Cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA. *Antimicrob Agents Chemother* 40 2004-2011.

Andreoni M, Faircloth M, Vugler L & Britt WJ. 1989. A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with Human Cytomegalovirus. *J Virol Methods* 23, 157-167.

Assier E, Bouzinba-Segard H, Stolzenberg M-C, Stephens R, Bardos J, Freemont P, Charron D, Trowsdale J & Rich T. 1999. Isolation, sequencing and expression of RED, a novel human gene encoding an acidic-basic dipeptide repeat. *Gene* 230, 145-154.

Baker TA, Mizuuchi M, Savilahti H & Mizuuchi K. 1993. Division of labor among monomers within the Mu transposase tetramer. *Cell* 74, 723-733.

Bergant Marusic M, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP & Banks L. 2012. Human Papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via Sorting Nexin 17. *Traffic* 13, 455-467.

Besse A, Campos AD, Webster WK & Darnay BG. 2007. TRAF-interacting protein (TRIP) is a RING-dependent ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 660-664.

Biron KK. 2006. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res* 71, 154-163.

Brankatschk B, Pons V, Parton RG & Gruenberg J. 2011. Role of SNX16 in the dynamics of tubulo-cisternal membrane domains of late endosomes. *PloS one* 6, e21771.

Braulke T & Bonifacino JS. 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*

1793, 605-614.

Brideau A, Enquist L & Tirabassi R. 2000. The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle. *J Clin Virol* 17, 69-82.

Britt WJ & Auger D . 1985. Identification of a 65000 dalton virion envelope protein of Human Cytomegalovirus. *Virus Res* 4, 31-36.

Britt WJ & Auger D. 1986. Synthesis and processing of the envelope gp55-116 complex of Human Cytomegalovirus. *J Virol* 58, 185-191.

Britt WJ & Vugler L. 1989. Processing of the gp55-116 envelope glycoprotein complex (gB) of Human Cytomegalovirus. *J Virol* 63, 403-410.

Britt WJ & Vugler L. 1992. Oligomerization of the Human Cytomegalovirus major envelope glycoprotein complex gB (gp55-116). *J Virol* 66, 6747-6754.

Buchkovich NJ, Maguire TG & Alwine JC. 2010. Role of the endoplasmic reticulum chaperone BiP, SUN domain proteins, and dynein in altering nuclear morphology during Human Cytomegalovirus infection. *J Virol* 84, 7005-7017.

Bugaric A, Zhe Y, Kerr MC, Griffin J, Collins BM, & Teasdale RD. 2011. VPS26A and VPS26B subunits define distinct Retromer complexes. *Traffic* 12, 1759-177.

Carlton J, Bujny M, Peter BJ, Oorschot VM, Rutherford A, Mellor H, Klumperman J, McMahon HT & Cullen PJ. 2004. Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high-curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr Biol* 14, 1791-1800.

Castillo JP & Kowalik TF. 2002. Human Cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* 290, 19-34.

Cepeda V & Fraile-Ramos A. 2011. A role for the SNARE protein Syntaxin 3 in Human Cytomegalovirus morphogenesis. *Cell Microbiol* 13, 846-858.

Cha T-a, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES & Spaete RR. 1996. Human Cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 70, 78-83.

Chee M, Bankier A, Beck S, Bohni R, Brown C, Cerny R, Horsnell T, Hutchison C 3rd, Kouzarides T, Martignetti J, Preddie E, Satchwell SC, Tomlinson P, Weston KM & Barrell BG. 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of Human Cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 154, 125-169.

- Chen DH, Jiang H, Lee M, Liu F & Zhou ZH. 1999. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact Human Cytomegalovirus. *Virology* 260, 10-16.
- Chook YM & Süel KE. 2011. Nuclear import by Karyopherin Betas: Recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1593-1606.
- Compton T, Nepomuceno RR & Nowlin DM. 1992. Human Cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* 191, 387-395.
- Compton T, Nowlin DM & Cooper NR. 1993. Initiation of Human Cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193, 834-841.
- Crump CM, Hung, C-H, Thomas L, Wan L & Thomas G. 2003. Role of PACS-1 in trafficking of Human Cytomegalovirus glycoprotein B and virus production. *J Virol* 77, 11105-11113.
- Cullen PJ. 2008. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for Sorting Nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 574-582.
- Das S, Vasanthi A & Pellett PE. 2007. Three-dimensional structure of the Human Cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *J Virol* 81, 11861-11869.
- Das S & Pellett PE. 2011. Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in Human Cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells. *J Virol* 85, 5864-5879.
- Datsenko KA & Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ & Thiry E. 2009. The order herpesvirales. *Arch Virol* 154, 171-177.
- De Matteis MA & Luini A. 2008. Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 273-284.
- Dittmer A & Bogner E. 2005. Analysis of the quaternary structure of the putative HCMV portal protein pUL104. *Biochemistry (Mosc)* 44, 759-765.
- Dittmer A, Drach J C, Townsend L B, Fischer A & Bogner E. 2005. Interaction of the putative Human Cytomegalovirus portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by benzimidazole-d-ribonucleosides. *J Virol* 79, 14660-14667.

- Eickmann M, Gicklhorn D & Radsak K. 2006. Cytomegaloviruses: Molecular biology and immunology., *Glycoprotein trafficking in virion morphogenesis*. Caister Academic Press, 245-264.
- Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, de Miranda P, Beauchamp L & Schaeffer HJ. 1977. The selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. Proc Natl Acad Sci U S A 74, 5716-5720.
- Ellson CD, Andrews S, Stephens LR & Hawkins PT. 2002. The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. J Cell Sci 115, 1099-1105.
- Evan GI, Lewis GK, Ramsay G & Bishop JM. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. Mol Cell Biol 5, 3610-3616.
- Fraile-Ramos A, Cepeda V, Elstak E & van der Sluijs P. 2010. Rab27a is required for Human Cytomegalovirus assembly. PloS one 5, e15318.
- Gey GO, Coffman WD & Kubicek MT. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res 12, 264-265.
- Gibson W. 2008. Human Cytomegalovirus, *Structure and formation of the cytomegalovirus virion*. Springer, 187-204.
- Gilbert C & Boivin G. 2005. Human Cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. Antimicrob Agents Chemother 49, 873-883.
- Graham F, Smiley J, Russell W & Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from Human Adenovirus type 5. J Gen Virol 36, 59-72.
- Griffin CT, Trejo J & Magnuson T. 2005. Genetic evidence for a mammalian Retromer complex containing Sorting Nexins 1 and 2. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 15173-15177.
- Haft CR, de la Luz Sierra M, Bafford R, Lesniak MA, Barr VA, & Taylor SI. 2000. Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. Mol Biol Cell 11, 4105-4116.
- Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, Wagner M, Gallina A, Milanesi G, Koszinowski U, Baldanti F & Gerna G. 2004. Human Cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. J Virol 78, 10023-10033.
- Hara S, Kiyokawa E, Iemura S-i, Natsume T, Wassmer T, Cullen PJ, Hiai H & Matsuda M. 2008. The DHR1 domain of DOCK180 binds to SNX5 and regulates cation-independent Mannose 6-phosphate receptor transport. Mol Biol Cell 19, 3823-3835.

- Hashimoto-Gotoh T, Franklin F, Nordheim A & Timmis K. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. *Gene* 16, 227-235.
- Haspot F, Lavault A, Sinzger C, Sampaio KL, Stierhof Y-D, Pilet P, Bressolette-Bodin C & Halary F. 2012. Human Cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PloS one* 7, e34795.
- Hayes F & Hallet B. 2000. Pentapeptide scanning mutagenesis: encouraging old proteins to execute unusual tricks. *Trends Microbiol* 8, 571-577.
- He T-C, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW & Vogelstein B. 1998. A simplified system for generating recombinant Adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2509-2514.
- Hierro A, Rojas AL, Rojas R, Murthy N, Effantin G, Kajava AV, Steven AC, Bonifacino JS & Hurley JH. 2007. Functional architecture of the Retromer cargo-recognition complex. *Nature* 449, 1063-1067.
- Hofer-Warbinek R, Schmid J, Mayer H, Winsauer G, Orel L, Mueller B, Wiesner C, Binder B & De Martin R. 2004. A highly conserved proapoptotic gene, IKIP, located next to the APAF1 gene locus, is regulated by p53. *Cell Death Differ* 11, 1317-1325.
- Holzenburg A, Dittmer A & Bogner E. 2009. Assembly of monomeric Human Cytomegalovirus pUL104 into portal structures. *J Gen Virol* 90, 2381-2385.
- Indran SV, Ballesteras M E & Britt WJ. 2010. Bicaudal D1-dependent trafficking of Human Cytomegalovirus tegument protein pp150 in virus-infected cells. *J Virol* 84, 3162-3177.
- Indran SV & Britt WJ. 2011. A role for the small GTPase Rab6 in assembly of Human Cytomegalovirus. *J Virol* 85, 5213-5219.
- Isaacson M, Juckem L & Compton T. 2008. Human Cytomegalovirus, *Virus entry and innate immune activation*. Springer, 85-100.
- Jacobsen T & Sifontis N. 2010. Drug interactions and toxicities associated with the anti-viral management of Cytomegalovirus infection. *Am J Health Syst Pharm* 67, 1417-1425.
- Jarvis MA, Fish KN, Söderberg-Naucler C, Streblow DN, Meyers HL, Thomas G & Nelson JA. 2002. Retrieval of Human Cytomegalovirus glycoprotein B from cell surface is not required for virus envelopment in astrocytoma cells. *J Virol* 76, 5147-5155.
- Kalejta RF. 2008. Tegument proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 249-265.

- Kari B & Gehrz R. 1993. Structure, composition and heparin binding properties of a Human Cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *J Gen Virol* 74, 255-264.
- Kerr MC, Bennetts JS, Simpson F, Thomas EC, Flegg C, Gleeson PA, Wicking C & Teasdale RD. 2005. A novel mammalian retromer component, Vps26B. *Traffic* 6, 991-1001
- Knauth P, Schlüter T, Czubayko M, Kirsch C, Florian V, Schreckenberger S, Hahn H & Bohnensack R. 2005. Functions of Sorting Nexin 17 Domains and Recognition Motif for P-selectin trafficking. *J Mol Biol* 347, 813-825.
- Koharudin LM, Furey W, Liu H, Liu Y-J & Gronenborn AM. 2009. The PHOX domain of Sorting Nexin 5 lacks Phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns (3) P) specificity and preferentially binds to Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns (4, 5) P₂). *J Biol Chem* 284, 23697-23707.
- Kropff B, Koedel Y, Britt W & Mach M . 2010. Optimal replication of Human Cytomegalovirus correlates with endocytosis of glycoprotein gpUL132. *J Virol* 84, 7039-7052.
- Landini M & Spaete RR . 1993. Human Cytomegalovirus structural proteins: a report of the first nomenclature workshop. *A Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease*. Excerpta Medica, 65-74.
- Le Blanc I, Luyet P-P, Pons V, Ferguson C, Emans N, Petiot A, Mayran N, Demaurex N, Fauré J, Sadoul RGPR & Jean G. 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol* 7, 653-664.
- Lee SY, Lee SY & Choi Y. 1997. TRAF-interacting protein (TRIP): a novel component of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)-and CD30-TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF- activation. *J Exp Med* 185, 1275-1286.
- Lim JP, Teasdale RD & Gleeson P A. 2012. SNX5 is essential for efficient macropinocytosis and antigen processing in primary macrophages. *Biology Open* 1, 904-914.
- Lim JP, Wang JT, Kerr MC, Teasdale RD & Gleeson PA. 2008. A role for SNX5 in the regulation of macropinocytosis. *BMC Cell Biol* 9.
- Liu B & Stinski MF. 1992. Human Cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* 66, 4434-4444.
- Liu H, Liu Z-Q, Chen CX-Q, Magill S, Jiang Y & Liu Y-J. 2006. Inhibitory regulation of EGF receptor degradation by Sorting Nexin 5. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 537-546.

- Liu Y & Biegalka BJ. 2002. The Human Cytomegalovirus UL35 gene encodes two proteins with different functions. *J Virol* 76, 2460-2468.
- Lurain NS & Chou S. 2010. Antiviral drug resistance of Human Cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 23, 689-712.
- Mach M, Kropff B, Dal Monte P & Britt W. 2000. Complex formation by Human Cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol* 74, 11881-11892.
- Marchini A, Liu H & Zhu H. 2001. Human Cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J Virol* 75, 1870-1878.
- McGough IJ & Cullen PJ. 2011. Recent advances in Retromer biology. *Traffic* 12, 963-971.
- Mehta, SK, Stowe RP, Feiveson, AH, Tying, SK & Pierson DL. 2000. Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. *J Infect Dis* 182, 1761-1764.
- Merino-Trigo A, Kerr MC, Houghton F, Lindberg A, Mitchell C, Teasdale RD & Gleeson PA. 2004. Sorting Nexin 5 is localized to a subdomain of the early endosomes and is recruited to the plasma membrane following EGF stimulation. *J Cell Sci* 117, 6413-6424.
- Mettenleiter TC, Klupp BG & Granzow H. 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* 143, 222-234.
- Michelson-Fiske S, Horodniceanu F & Guillon J-C. 1977. Immediate early antigens in Human Cytomegalovirus infected cells. *Nature* 270, 615-617.
- Mim C & Unger VM. 2012. Membrane curvature and its generation by BAR proteins. *Trends Biochem Sci* 37, 526-533.
- Mocarski E, Shenk T & Pass R. 2007. *Fields Virology*, 5th ed., *Cytomegaloviruses*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2702-2772.
- Mocarski ES, Kemble GW, Lyle JM & Greaves RF. 1996. A deletion mutant in the Human Cytomegalovirus gene encoding IE1 (491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11321-11326.
- Murphy E, Rigoutsos I, Shibuya T & Shenk TE. 2003. Reevaluation of Human Cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13585-13590.
- Murphy E, Yu D, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Jarvis MA, Hahn, G, Nelson, JA, Myers, RM & Shenk, TE. 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of Human Cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14976-14981.
- Nixdorf R, Klupp BG, Karger A & Mettenleiter TC. 2000. Effects of truncation of

the carboxy terminus of pseudorabies virus glycoprotein B on infectivity. J Virol 74, 7137-7145.

Nowak B, Sullivan C, Sarnow P, Thomas R, Bricout F, Nicolas J, Fleckenstein B & Levine A .1984. Characterization of monoclonal antibodies and polyclonal immune sera directed against Human Cytomegalovirus virion proteins. Virology 132, 325-338.

Otsuki T, Kajigaya S, Ozawa K & Liu J M. 1999. SNX5, a new member of the Sorting Nexin family, binds to the Fanconi anemia complementation group A protein. Biochem Biophys Res Commun 265, 630-635.

Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJG, Evans PR & McMahon HT. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. Science 303, 495-499.

Phillips SL & Bresnahan WA. 2011. Identification of binary interactions between Human Cytomegalovirus virion proteins. J Virol 85, 440-447.

Pontén J & Macintyre EH. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica 74, 465-486.

Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, Bogner E, Kern H, Eis-Hübinger A & Reschke M. 1996. Retrieval of Human Cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. Arch Virol 141, 557-572.

Rajendran RR, Nye AC, Frasor J, Balsara RD, Martini PG & Katzenellenbogen B S. 2003. Regulation of nuclear receptor transcriptional activity by a novel DEAD box RNA helicase (DP97). J Biol Chem 278, 4628-4638.

Reeves M & Sinclair J. 2008. Human Cytomegalovirus, *Aspects of Human Cytomegalovirus latency and reactivation*. Springer, 297-313.

Rojas R, Kametaka S, Haft CR & Bonifacio JS. 2007. Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of Retromer with endosomes and the trafficking of Mannose 6-phosphate receptors. Mol Cell Biol 27, 1112-1124.

Rowe WP, Janet WH, Samuel W, Horace CT & Robert JH. 1956. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. Proc Soc Exp Biol Med, 418-424.

Ruzsics Z & Koszinowski U. 2008. Human Cytomegalovirus, *Mutagenesis of the cytomegalovirus genome*. Springer, 41-61.

Salsman J, Jagannathan M, Paladino P, Chan P-K, Dellaire G, Raught B & Frappier L.

2012. Proteomic profiling of the Human Cytomegalovirus UL35 gene products reveals a role for UL35 in the DNA repair response. *J Virol* 86, 806-820.
- Salsman J, Wang X & Frappier L. 2011. Nuclear body formation and PML body remodeling by the Human Cytomegalovirus protein UL35. *Virology* 414, 119-129.
- Sambrook J & Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, *Appendix: SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*. CSHL press, A8.43.
- Sanchez V, Greis K D, Sztul E & Britt WJ. 2000. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during Human Cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* 74, 975-986.
- Schierling K. 2004. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen des humanen Zytomegalievirus und Charakterisierung einer UL35-Deletionsmutante. Dissertation, Universität Ulm.
- Schierling K, Buser C, Mertens T & Winkler M. 2005. Human Cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation. *J Virol* 79, 3084-3096.
- Schierling K, Stamminger T, Mertens T & Winkler M. 2004. Human Cytomegalovirus tegument proteins ppUL82(pp71) and ppUL35 interact and cooperatively activate the major immediate-early enhancer. *J Virol* 78, 9512-9523.
- Schleiss MR. 2008. Human Cytomegalovirus, *Cytomegalovirus vaccine development*. Springer, 361-382.
- Schoppel K, Hassfurth E, Britt W, Ohlin M, Borrebaeck C & Mach M. 1996. Antibodies specific for the antigenic domain 1 of glycoprotein B (gpUL55) of Human Cytomegalovirus bind to different substructures. *Virology* 216, 133-145.
- Shen A, Lei J, Yang E, Pei Y, Chen Y-C, Gong H, Xiao G & Liu F. 2011. Human Cytomegalovirus primase UL70 specifically interacts with cellular factor Snapin. *J Virol* 85, 11732-11741.
- Shibayama H, Takai E, Matsumura I, Kouno M, Morii E, Kitamura Y, Takeda J & Kanakura Y. 2004. Identification of a cytokine-induced antiapoptotic molecule anamorsin essential for definitive hematopoiesis. *J Exp Med* 199, 581-592.
- Simpson JA, Chow JC, Baker J, Avdalovic N, Yuan S, Au D, Co M, Vasquez M, Britt W & Coelingh K. 1993. Neutralizing monoclonal antibodies that distinguish three antigenic sites on Human Cytomegalovirus glycoprotein H have conformationally distinct binding

- sites. J Virol 67, 489-496.
- Sinclair J. 2008. Human Cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. J Clin Virol 41, 180-185.
- Sinclair J & Sissons P. 2006. Latency and reactivation of Human Cytomegalovirus. J Gen Virol 87, 1763-1779.
- Sinzger C, Digel M & Jahn G. 2008. Human Cytomegalovirus, *Cytomegalovirus cell tropism*. Springer, 63-83.
- Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS & Jahn G. 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of Human Cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. J Gen Virol 76, 741-750.
- Sinzger C, Hahn G, Digel M, Katona R, Sampaio KL, Messerle M, Hengel H, Koszowski U, Brune W & Adler B. 2008. Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from Human Cytomegalovirus TB40/E. J Gen Virol 89, 359-368.
- Sinzger C, Müntefering H, Löning T, Stöss H, Plachter B & Jahn G. 1993. Cell types infected in Human Cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. Virchows Arch 423, 249-256.
- Sinzger C, Schmidt K, Knapp J, Kahl M, Beck R, Waldman J, Hebart H, Einsele H & Jahn G. 1999. Modification of Human Cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. J Gen Virol 80, 2867-2877.
- Smith MG. 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. Proc Soc Exp Biol Med 92, 424-30.
- Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VTK, Hein MY, Huang S-X, Ma M, Shen B, Qian S-B, Hengel H, Mann M, Ingolia NT & Weissman JS. 2012. Decoding Human Cytomegalovirus. Science 338, 1088-1093.
- Stinski MF. 1978. Sequence of protein synthesis in cells infected by Human Cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. J Virol 26, 686-701.
- Stinski M & Meier J. 2007. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis., *Immediate-early CMV gene regulation and function*,. Cambridge University Press, 241-263.
- Sung H & Schleiss MR. 2010. Update on the current status of cytomegalovirus vaccines. Expert Rev Vaccines 9 1303-1314.

- Tandon R, AuCoin, DP & Mocarski ES. 2009. Human Cytomegalovirus exploits ESCRT machinery in the process of virion maturation. *J Virol* 83, 10797-10807.
- Tandon R & Mocarski ES. 2012. Viral and host control of Cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol* 20, 392–401.
- Taylor-Wiedeman J, Sissons J, Borysiewicz LK, Sinclair J. 1991. Monocytes are a major site of persistence of Human Cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 72, 2059-2064.
- Teasdale RD, Loci D, Houghton F, Karlsson L & Gleeson PA. 2001. A large family of endosome-localized proteins related to Sorting Nexin 1. *Biochem J* 358, 7-16.
- Terhune SS, Schröer J & Shenk T. 2004. RNAs are packaged into Human Cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol* 78, 10390-10398.
- Tirabassi R & Enquist L. 1999. Mutation of the YXXL endocytosis motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus gE. *J Virol* 73, 2717-2728.
- Tischer BK, von Einem J, Kaufer B & Osterrieder N. 2006. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* 40, 191-197.
- Torres-Madriz G & Boucher HW. 2008. Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 47, 702-711.
- Towler MC, Gleeson PA, Hoshino S, Rahkila P, Manalo V, Ohkoshi N, Ordahl C, Parton RG & Brodsky FM. 2004. Clathrin isoform CHC22, a component of neuromuscular and myotendinous junctions, binds Sorting Nexin 5 and has increased expression during myogenesis and muscle regeneration. *Mol Biol Cell* 15, 3181-3195.
- Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Toli L, Wang D, Camp DG, Rodland K, Wiley S, Britt W, Shenk T, Smith RD & Nelson JA. 2004. Identification of proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 78, 10960-10966.
- Wang D & Shenk T. 2005. Human Cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18153-18158.
- Wassmer T, Attar N, Bujny MV, Oakley J, Traer CJ & Cullen PJ. 2007. A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian Retromer. *J Cell Sci* 120, 45-54.

- Wassmer T, Attar N, Harterink M, van Weering JR, Traer CJ, Oakley J, Goud B, Stephens DJ, Verkade P, Korswagen HC & Cullen PJ. 2009. The Retromer Coat Complex Coordinates Endosomal Sorting and Dynein-Mediated Transport, with Carrier Recognition by the trans-Golgi Network. *Dev Cell* 17, 110-122.
- White E & Spector D. 2007. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, *Early CMV gene expression and function*. Cambridge University Press, 264-294.
- Winkler M, Rice SA & Stamminger T. 1994. UL69 of Human Cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. *J Virol* 68, 3943-3954.
- Yeh P-C, Yeh C-C, Chen Y-C & Juang Y-L. 2012. RED, a spindle pole-associated protein, is required for kinetochore localization of MAD1, mitotic progression, and activation of the spindle assembly checkpoint. *J Biol Chem* 287, 11704-11716.
- Yoo K-W, Kim E-H, Jung S-H, Rhee M, Koo B-K, Yoon K-J, Kong Y-Y & Kim C-H. 2006. SNX5, as a Mind bomb-binding protein, is expressed in hematopoietic and endothelial precursor cells in zebrafish. *FEBS Lett* 580, 4409-4416.
- Yu X, Shah S, Lee M, Dai W, Lo P, Britt W, Zhu H, Liu F & Hong Zhou Z. 2011. Biochemical and structural characterization of the capsid-bound tegument proteins of Human Cytomegalovirus. *J Struct Biol* 174, 451-460.
- Zagursky RJ, Baumeister K, Lomax N & Berman ML 1985. Rapid and easy sequencing of large linear double-stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. *Gene Anal Tech* 2, 89-94.
- de Zarate IBO, Cantero-Aguilar L, Longo M, Berlioz-Torrent C & Rozenberg F. 2007. Contribution of endocytic motifs in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B to virus replication and cell-cell fusion. *J Virol* 81, 13889-13903.

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
BAC	künstliches bakterielles Chromosom (<i>bacterial artificial Chromosome</i>)
CI-M6PR	<i>cation-independent mannose-6-phosphate receptor</i>
Cm	Chloramphenicol
CoIP	Koimmunopräzipitation
CPE	zytopathischer Effekt (<i>cytopathic Effect</i>)
C-terminal	Carboxyterminal
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach Infektion (<i>Days post Infection</i>)
E	früh (<i>early</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
eYFP	<i>enhanced yellow fluorescent Protein</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Schwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gp	Glykoprotein
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HFF	humane Vorhaut-Fibroblasten (<i>Human Foreskin Fibroblasts</i>)
hpi	Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>)
IE	sehr früh (<i>immediate early</i>)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	spät (<i>late</i>)
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDM	<i>Monocyte-derived macrophag</i>
MIEP	<i>Major immediate-early Promotor</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
NP40	Nonidet-P 40
N-terminal	Aminoterminal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFU	Plaque-forming Unit

pp	Phosphoprotein
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per Minute</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SNX	Sorting Nexin
TGN	trans-Golgi Netzwerk
UL	<i>unique long</i>
US	<i>unique short</i>

Danksagung

Bei meinem Betreuer PD Dr. Michael Winkler möchte ich für das Überlassen des Promotionsthemas, die unkomplizierte Betreuung und die unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft herzlich bedanken.

Prof. Dr. Fickenscher möchte ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Infektionsmedizin, die Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen danken.

Bei Prof Dr. Beitz bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen Kollegen Dr. Oliver Braum, Linda Bremer, Anne Brunnemann, Tanja Spieckermann und Dr. Heike Hofmann-Winkler danke ich für die gute Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Katharina für ihre unerschöpfliche Unterstützung.

Publikationen

Publikationen

Maschkowitz G, Gärtner S, Hofmann-Winkler H, Fickenscher H & Winkler M. Interaction of human cytomegalovirus ppUL35 and ppUL35A with Sorting Nexin 5 regulates glycoprotein gpUL55(gB) localization. (*zur Veröffentlichung eingereicht*)

Pretsch R, Kleining V, Sinzger C, Reinhardt B, Vaalma S, Frascaroli G, Lüske A, Maschkowitz G, Walther P, Hahn G, Mertens T & Winkler M. The Human Cytomegalovirus tegument protein pUL24 is critical for infection of endothelial, epithelial and macrophage cells. (*in Vorbereitung*)

Plenarvorträge

Maschkowitz G & Winkler M. 2012. HCMV tegument protein ppUL35 modulates endosomal sorting via interaction with Sorting Nexin 5. 7th Mini Herpes-Virus Workshop, Hamburg

Maschkowitz G & Winkler M. 2013. HCMV tegument protein ppUL35 modulates endosomal sorting via interaction with Sorting Nexin 5. 23rd Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel

Poster

Winkler M, Pretsch R, Sinzger C, Kleining V, Vaalma S, Maschkowitz G, Frascaroli G, Reinhardt B, Hahn G & Mertens T. 2012. pUL24 a member of Human Cytomegalovirus US22 family is important for infection of endothelial cells, epithelial cell and macrophages. 22nd Annual Meeting of the Society for Virology, Essen

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde von mir nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis und unter der wissenschaftlichen Anleitung meiner akademischen Betreuer selbstständig verfasst. Nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen wurden benutzt. Diese Arbeit oder Teile davon wurde bisher an keiner anderen Fakultät im Rahmen einer Prüfung vorgelegt. Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Gregor Maschkowitz